

**Virtuelles Screening, strukturbasiertes Design und  
Kristallstrukturanalyse von Inhibitoren der  
tRNA-Guanin Transglykosylase,  
ein Target der Bakterienruhr**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie  
der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG  
vorgelegt von

**Ruth Brenk**

aus Jugenheim,  
jetzt Seeheim-Jugenheim

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation angenommen am:

5. Februar 2003

Erstgutachter:

Prof. Dr. G. KLEBE

Zweitgutachter:

Prof. Dr. T. CARELL

Tag der mündlichen Prüfung:

5. Februar 2003

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. G. KLEBE am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Dezember 1999 bis Dezember 2002 durchgeführt.





# Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ACD	Available Chemicals Directory
AEGC	ASINEX Express Gold Collection
AEPC	ASINEX Express Platinum Collection
Amp	Ampicillin
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
CSD	CAMBRIDGE STRUCTURAL DATABASE
Cm	Chloramphenicol
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECY2	nicht modifizierte <i>E. coli</i> tRNA <sup>Tyr</sup>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure
IBS	INTERBIOSCREEN
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -galaktosid
kb	Kilobasen
KL	Kristallisationslösung
Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani (Komplexmedium)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
NNCD	NovoNordisk Compound Database
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	PROTEIN DATA BANK
<i>P. horikoshii</i>	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid-Lösung
PPase	anorganische Pyrophosphatase
preQ <sub>0</sub>	7-Cyano-7-deazaguanin
preQ <sub>1</sub>	7-Aminomethyl-7-deazaguanin
QueA	S-Adenosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz
TCA	Trichloressigsäure
TGT	tRNA-Guanin Transglykosylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
VT	Volumenteil
w.t.	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
<i>Z. mobilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
1.1	Strukturbasiertes Wirkstoff-Design . . . . .	1
1.2	Aufgabenstellung . . . . .	6
<b>2</b>	<b>Biologisches System</b>	<b>8</b>
2.1	Bakterienruhr . . . . .	8
2.2	Shigellen . . . . .	9
2.3	Molekulare und zelluläre Pathogenese der Bakterienruhr . . . . .	9
2.4	Die Rolle der tRNA-Guanin Transglykosylase in der Pathogenese . . . . .	11
2.5	Funktion der tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) . . . . .	13
2.6	Struktur der prokaryontischen TGT . . . . .	15
2.6.1	Sekundärstruktur der <i>Z. mobilis</i> TGT . . . . .	16
2.6.2	Aktives Zentrum der <i>Z. mobilis</i> TGT . . . . .	17
2.6.3	tRNA Bindung durch <i>Z. mobilis</i> TGT . . . . .	17
2.7	Struktur der archaeobakteriellen TGT . . . . .	20
2.7.1	Aktives Zentrum der <i>P. horikoshii</i> TGT . . . . .	20
2.8	Eukaryontische TGT . . . . .	22
2.9	Inhibitoren der TGT . . . . .	23
2.9.1	Studien mit prokaryontischer TGT . . . . .	23
2.9.2	Studien mit eukaryontischer TGT . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>27</b>
3.1	Ansätze zur Entwicklung eines Bindungsassays . . . . .	27
3.1.1	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Bestimmung von Bindungskonstanten . . . . .	29
3.1.1.1	Änderung der Fluoreszenz des Proteins . . . . .	29
3.1.1.2	Änderung der Fluoreszenz des Liganden . . . . .	31
3.1.2	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-spektroskopische Untersuchungen . . . . .	33
3.1.3	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	35
3.2	Mutationsstudie . . . . .	38
3.2.1	Konstruktion und Reinigung von TGT(Y106F) . . . . .	39
3.2.2	Kristallstruktur der Y106F-TGT . . . . .	39
3.2.3	Biochemische Charakterisierung der Y106F-TGT . . . . .	41
3.2.4	Schlussfolgerungen . . . . .	44
3.3	Virtuelles Screening basierend auf einem neuem Bindungsmodus . . . . .	46

3.3.1	Generierung eines zusammengesetzten Pharmakophor-Modells . . . . .	49
3.3.2	Virtuelles Screening . . . . .	53
3.3.3	Testung auf Inhibition . . . . .	57
3.3.4	Schlussfolgerungen . . . . .	60
3.4	Optimierung von Hits aus dem virtuellen Screening . . . . .	62
3.4.1	Dihydropyridazinochinolintrione . . . . .	63
3.4.2	Tetraazaanthrazendion . . . . .	69
3.4.3	Pterine . . . . .	69
3.4.4	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen . . . . .	79
3.5	Chinazolinone als Inhibitoren der TGT . . . . .	82
3.5.1	2-Amino-3 <i>H</i> -chinazolin-4-on als Leitstruktur . . . . .	82
3.5.2	Optimierung der Leitstruktur durch Ausfüllen einer lipophilen Tasche . . . . .	88
3.5.3	Kristallstruktur der <i>Z. mobilis</i> TGT bei pH 5,5 . . . . .	92
3.5.4	„Soaking“ von Chinazolin-4-onen bei pH 5,5 . . . . .	98
3.5.5	Ein dramatischer Einfluss von Schwefel auf die Bindungsenergie	101
3.5.6	Weitere Chinazolin-4-on-Derivate . . . . .	103
3.5.7	Imidazochinazolinon als Erweiterung der Chinazolinone . . . . .	111
3.5.8	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen . . . . .	115
3.6	Virtuelles Screening / Wasser . . . . .	117
3.6.1	„Hot Spot“-Analyse der Bindetasche . . . . .	117
3.6.2	Generierung eines Pharmakophor-Modells . . . . .	120
3.6.3	Virtuelles Screening . . . . .	121
3.6.4	Testung auf Inhibition . . . . .	124
3.6.5	Schlussfolgerungen . . . . .	129
3.7	$\beta$ -Carbolinone als Inhibitoren der TGT . . . . .	131
3.7.1	$\beta$ -Carbolinone mit Substituenten in der 7-Position . . . . .	134
3.7.2	Vorschläge zur weiteren Optimierung der $\beta$ -Carbolinone . . . . .	136
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>139</b>
4.1	Zusammenfassung . . . . .	139
4.2	Ausblick . . . . .	142
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>144</b>
5.1	Chemikalien, Enzyme und Säulenmaterialien . . . . .	144
5.2	Biochemische Methoden . . . . .	144
5.2.1	Medien . . . . .	144

5.2.2	Bakterienstämme und Plasmide . . . . .	145
5.2.3	Gehaltsbestimmung von Lösungen biologischer Polymere . . . . .	146
5.2.3.1	Gehaltsbestimmung von DNA-Lösungen . . . . .	146
5.2.3.2	Gehaltsbestimmung von <i>E. coli</i> tRNA <sup>Tyr</sup> -Lösungen . . . . .	146
5.2.3.3	Gehaltsbestimmung von Protein-Lösungen . . . . .	146
5.2.4	Klonierungstechniken . . . . .	147
5.2.4.1	Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR . . . . .	147
5.2.4.2	Transformation . . . . .	148
5.2.4.3	Plasmid Mini-Präparation . . . . .	148
5.2.4.4	Sequenzierung . . . . .	148
5.2.5	Präparation der <i>Z. mobilis</i> TGT . . . . .	148
5.2.5.1	Zellanzucht und Überexpression der <i>Z. mobilis</i> TGT in <i>E. coli</i> . . . . .	149
5.2.5.2	Herstellung eines Rohextraktes . . . . .	149
5.2.5.3	Ammoniumsulfat-Fällung . . . . .	149
5.2.5.4	Aufreinigung der TGT mittels Säulenchromatographie . . . . .	150
5.2.6	Präparation der T7 RNA Polymerase . . . . .	151
5.2.6.1	Zellanzucht und Überexpression der T7 RNA Polyme- rase in <i>E. coli</i> . . . . .	151
5.2.6.2	T7 RNA Polymerase Extraktion . . . . .	152
5.2.6.3	Reinigung der T7 RNA Polymerase . . . . .	152
5.2.7	Präparation und Reinigung von nicht modifizierter <i>E. coli</i> tRNA <sup>Tyr</sup> . . . . .	153
5.2.7.1	Ethanol-Fällung . . . . .	153
5.2.7.2	Plasmid-Präparation und Reinigung . . . . .	153
5.2.7.3	Restriktionsverdau von ptRNA2 mit <i>Bst</i> N I . . . . .	154
5.2.7.4	<i>In vitro</i> -Transkription von ECY2 . . . . .	154
5.2.7.5	Reinigung der ECY2 . . . . .	155
5.2.7.6	Monomerisierung der ECY2 . . . . .	155
5.2.8	Enzymassay der <i>Z. mobilis</i> TGT . . . . .	156
5.2.8.1	Bestimmung der kinetischen Parameter . . . . .	156
5.2.8.2	Bestimmung der Inhibitionskonstanten . . . . .	158
5.3	Proteinstrukturaufklärung . . . . .	160
5.3.1	Kristallisation der <i>Z. mobilis</i> TGT . . . . .	160
5.3.2	Kokristallisation der <i>Z. mobilis</i> TGT mit Liganden . . . . .	161
5.3.3	„Soaking“ von TGT-Kristallen mit Liganden . . . . .	161
5.3.4	Sammlung von Datensätzen . . . . .	162

---

5.3.5	Verfeinerung der Datensätze . . . . .	162
5.4	Methoden des computergestützten Wirkstoff-Designs . . . . .	164
5.4.1	Berechnung von günstigen Wechselwirkungsfeldern in der Binde- tasche . . . . .	164
5.4.1.1	Berechnungen mit SUPERSTAR . . . . .	164
5.4.1.2	Berechnungen mit DRUGSCORE . . . . .	165
5.4.2	Minimierung von Liganden in der Bindetasche . . . . .	166
5.4.3	Generierung von Datenbanken für das virtuelle Screening . . . . .	166
5.4.4	Strukturbasierte Pharmakophor-Generierung . . . . .	167
5.4.4.1	Zusammengesetzter Pharmakophor basierend auf TGT-4 und TGT-18 . . . . .	167
5.4.4.2	Pharmakophor basierend auf TGT-4 sowie „Hot Spots“ für Wasserstoffbrücken-Akzeptoren . . . . .	168
5.4.5	Hierarchische Datenbankfilterung . . . . .	169
5.4.6	Dockingmethoden . . . . .	170
5.5	Sonstige Methoden . . . . .	171
5.5.1	Fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen . . . . .	171
5.5.2	SPR-Messungen . . . . .	171
5.5.3	Bestimmung von Löslichkeiten . . . . .	171
5.5.4	Bestimmung von $pK_a$ -Werten . . . . .	172
5.5.4.1	Zuordnung der $pK_a$ -Werte zu Molekülfragmenten . . . . .	172
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>174</b>
A.1	Datensammlung und Verfeinerung . . . . .	174
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>179</b>

# 1 Einleitung und Problemstellung

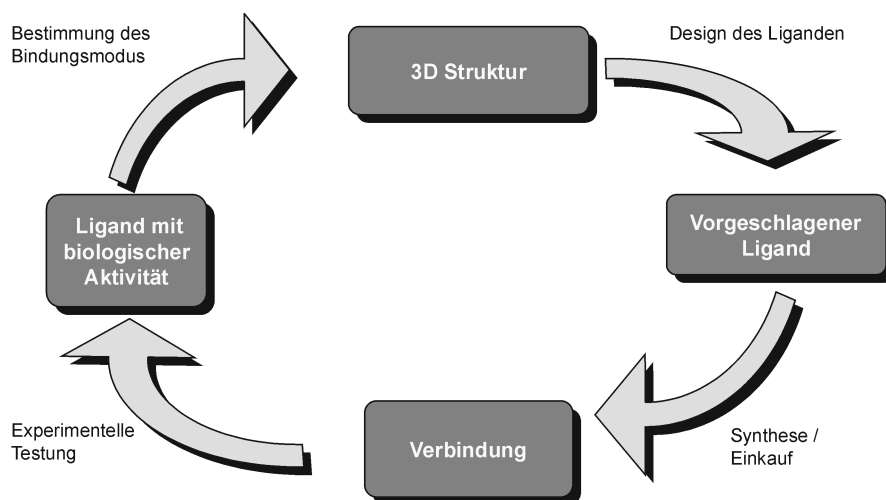
## 1.1 Strukturbasiertes Wirkstoff-Design

Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms [Lander et al., 2001; Venter et al., 2001] ist ein neues Zeitalter für die Arzneimittelforschung angebrochen. Die heute bekannten Arzneistoffe greifen nur an etwa 500 verschiedenen Zielmolekülen (Ionenkanäle, Enzyme, Rezeptoren, auch „Targets“ genannt) an [Drews, 2000]. Demgegenüber wurden durch das Humane Genom Projekt die Sequenzen von ca 30.000 Genen entschlüsselt. Die genau Anzahl der sich darunter befindenden *Targets* ist noch nicht bekannt. Sie wird aber wesentlich höher liegen als die Zahl der zur Zeit bekannten Angriffspunkte. Zudem ist von einigen human-pathogen Organismen wie z. B. Plasmodium falciparum [Gardner et al., 2002] oder Mycobacterium tuberculosis [Philipp et al., 1996] das Genom bereits sequenziert oder die Sequenzierung in Angriff genommen worden [Buchanan et al., 2002]. Auch hier werden sich neue Angriffspunkte für Arzneistoffe finden lassen.

Die Herausforderung für die Pharmaindustrie ist es nun, aus der Vielzahl von Genen geeignete *Targets* herauszufiltern [Swindells & Overington, 2002]. Ist ein solches gefunden, beginnt die Suche nach einer Leitstruktur für Liganden dieses Zielmoleküls. Dazu werden derzeit hauptsächlich zwei Strategien verfolgt. Die häufigste Vorgehensweise ist es, große Molekülbibliotheken *in vitro* auf Aktivität zu durchmustern (High-Throughput Screening, HTS) [Inglese, 2002; Smith, 2002]. Oft geschieht dies in Verbindung mit kombinatorischer Chemie [Oliver & Abell, 1999]. Dabei werden zunächst ganze Substanzbibliotheken synthetisiert und anschließend mit geeigneten Assays auf ihre Wirksamkeit getestet [Carell et al., 1994]. Durch automatisierte Verfahren ist es möglich, in kurzer Zeit eine sehr große Anzahl an Verbindungen experimentell zu überprüfen. Schätzungen gehen davon aus, dass es bereits 2003 üblich sein wird, 1 Million Verbindungen pro *Target* zu testen [Bajorath, 2002]. Allerdings sind die Erfolgsquoten sehr ernüchternd. Die Trefferrate liegt häufig unter einem Promille der Anzahl eingesetzter Substanzen [Sills, 1998; Lahana, 1999].

Eine andere Strategie ist es, ausgehend von der dreidimensionalen (3D) Struktur des molekularen Rezeptors Inhibitoren rational zu entwerfen. Dieses Vorgehen wird als strukturbasiertes Wirkstoff-Design bezeichnet. Die so entworfenen Verbindungen werden anschließend im Experiment auf Aktivität überprüft. Die dabei gewonnenen Er-

kenntnisse fließen dann wieder als neue Information in den Design-Zyklus zurück (Abb. 1.1) [Klebe, 2000].



**Abb. 1.1 Strukturbasiertes Wirkstoff-Design.**

Voraussetzung für diesen Ansatz ist, dass die 3D Struktur des Zielmoleküls bekannt ist. Sie kann entweder mit Hilfe der Röntgenkristallographie oder der NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Die Zahl der öffentlich zugänglichen 3D Strukturen von Proteinen ist in den letzten Jahren exponentiell angestiegen (Abb. 1.2) [Bernstein et al., 1977; Berman et al., 2000]. Zur Zeit sind über 19.000 Strukturen von Proteinen und Nukleinsäuren in der Protein-Datenbank (PDB) gespeichert (Stand Nov. 2002). Darunter befinden sich 1771 nicht redundante Proteinketten (Stand April 2002) [Hobohm & Sander, 1994]. Es wird davon ausgegangen, dass in naher Zukunft gerade die Anzahl an nicht redundanten 3D Strukturen weiter steigen wird. Nach der kompletten Sequenzierung des humanen Genoms sowie des Genoms weiterer Organismen wurden zahlreiche Structural Genomics Initiativen gegründet. Diese zielen darauf ab, im großen Maßstab durch automatisierte Prozesse Gene zu klonieren, transformieren, exprimieren und die erhaltenen Proteine anschließend zu reinigen, um so durch Hochdurchsatz-NMR-Spektroskopie oder -Röntgenkristallographie neue Proteinstrukturen zu bestimmen [Mittl & Grutter, 2001]. Dadurch soll für jede Proteinfaltungsklasse mindestens eine repräsentative Struktur bestimmt werden. Durch Homologie-Modellierung können dann die Strukturen der restlichen Proteine modelliert werden [Sanchez et al., 2000]. Allerdings ist die durch Modellierung erzielbare Auflösung oft noch nicht ausreichend für das Design von Wirkstoffen [Maggio & Ramnarayan, 2001; Sanchez et al., 2000]. Zur Zeit wird aber an Methoden gearbeitet, um gerade die Genauigkeit in der Bindetasche durch die Einbeziehung von Kenntnissen über Inhibitoren zu verbessern [Schaffer-



hans & Klebe, 2001]. Ein inhärenter Nachteil der Homologie-Modellierung bleibt dabei, dass der vorgeschlagene Bindungsmodus von Liganden nicht experimentell überprüft werden kann. Es wird deshalb ein neuer Ansatz entwickelt, der darauf abzielt, durch zielgerichtete Mutationen die physiko-chemischen Eigenschaften der Bindetasche eines gut kristallisierenden verwandten Proteins so zu verändern, dass die Bindetasche des eigentlich interessierenden Zielproteins erhalten wird [Rauh et al., 2002].

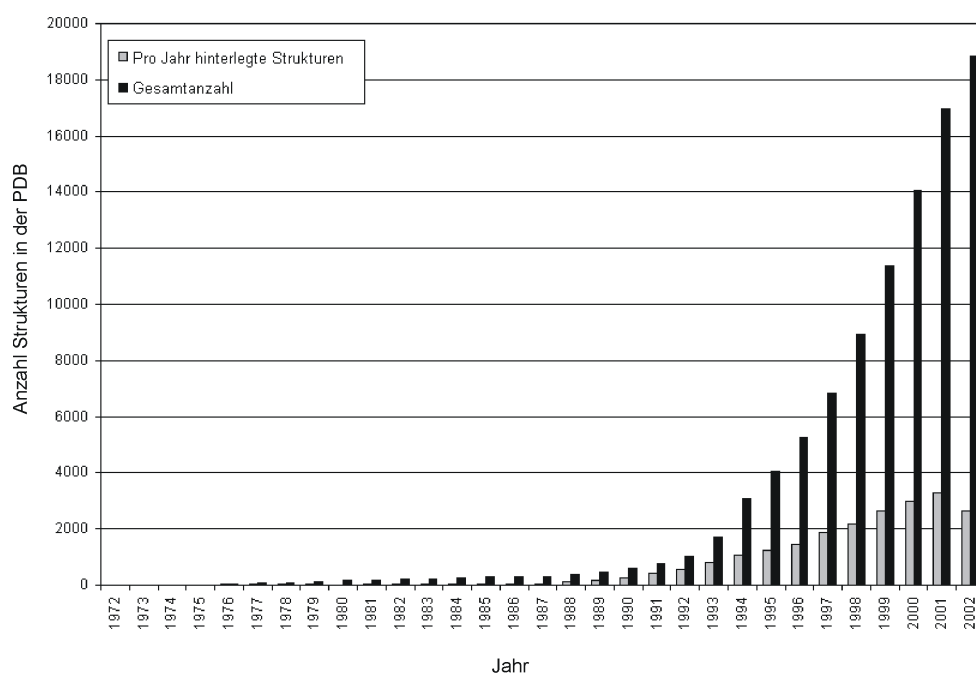


Abb. 1.2 Entwicklung der Protein-Datenbank (PDB). Stand Oktober 2002.

Ausgangspunkt für das strukturbasierte Wirkstoff-Design ist die Struktur des molekularen Rezeptors, idealerweise im Komplex mit einem Liganden. Der erste Schritt ist die genaue Analyse der Bindetasche. Durch geeignete Methoden können ausgezeichnete Wechselwirkungsbereiche („Hot Spots“) in der Bindetasche berechnet und visualisiert werden [Goodford, 1985; Miranker & Karplus, 1991; Böhm, 1992a; Verdonk et al., 1999; Gohlke et al., 2000b]. Dieses Wissen kann dann genutzt werden, um neue Inhibitoren zu entwerfen oder bekannte zu optimieren.

Beim Computer unterstützten *De novo*-Design werden Liganden schrittweise in der Bindetasche aufgebaut. Dazu werden zunächst Atome oder Molekülfragmente in der Bindetasche platziert. Anschließend werden durch die Verknüpfung dieser Fragmente neue Leitstrukturen oder optimierte Inhibitoren erhalten (z. B. [Moon & Howe, 1991; Böhm, 1992b; Rotstein & Murcko, 1993; Leach & Kilvington, 1994; Clark et al., 1995; Miranker & Karplus, 1995; DeWitte & Shakhnovich, 1996]).

Alternativ dazu können auch große Datenbanken virtuell durchmustert werden („virtuelles Screening“). Dabei werden die in den Datenbanken gespeicherten kleinen Moleküle durch so genannte Docking-Programme in die Proteinbindetasche eingepasst [Walters et al., 1998; Good, 2001; Sottriffer et al., 2003]. Gängige Docking-Programme betrachten die Bindetasche als rigide, wohingegen der Ligand flexibel behandelt wird [Rarey et al., 1996; Jones et al., 1997; Ewing et al., 2001]. Durch schnellere Computer ist es mittlerweile aber auch bis zu einem gewissen Grad möglich, Proteinflexibilität während des Dockings zu berücksichtigen [Carlson, 2002].

Entscheidend für den Erfolg des *De novo* Designs und des virtuellen Screenings ist eine zuverlässige Vorhersage der Affinität der Verbindung zu ihrem Rezeptor („Scoring“) [Gohlke & Klebe, 2002]. Vergleichende Studien haben gezeigt, dass die vorhandenen Bewertungsfunktionen für unterschiedliche Proteine unterschiedlich gute Ergebnisse liefern [Bissantz et al., 2000; Stahl & Rarey, 2001]. Auch die Güte der Vorhersage der Docking-Programme ist vom jeweiligen Protein abhängig. Deshalb muss für jeden Rezeptor die günstigste Kombination von Docking-Programm und Bewertungsfunktion neu gefunden werden.

Die durch *De novo*-Design oder virtuelles Screening vorgeschlagenen Liganden werden entweder käuflich erworben oder synthetisiert. Mit einem Bioassay wird anschließend ihre Affinität bestimmt. Idealerweise wird als letzter Schritt die angenommene Bindungsgeometrie röntgenkristallographisch oder NMR-spektroskopisch überprüft. Damit schließt sich der Design-Zyklus. Die beim Durchlaufen des Zyklus gewonnenen Erkenntnisse können dann in den nächsten Zyklus einfließen und so die weitere Optimierung der Inhibitoren leiten.

Ein festbindender Ligand ist aber noch nicht automatisch ein Arzneistoff. Entscheidend dafür, ist das der Ligand auch gute ADME-Eigenschaften<sup>1</sup> besitzt. Mehr als 90 % der Entwicklungskandidaten erreichen wegen ungünstigen Eigenschaften nie den Markt. Deshalb wird versucht, das *in vivo* ADME-Verhalten der Moleküle zu simulieren und die Kenntnisse von Beginn an in das Design einfließen zu lassen, um so die Entwicklungskosten zu reduzieren [Beresford et al., 2002].

Eine weit verbreitete Regel zur Resorptionsvorhersage ist die „rule-of-five“ von Lipinski et al. [1997]. Diese Regel besagt, dass eine schlechte Resorption wahrscheinlich ist, wenn die Verbindung mehr als zwei der folgenden Bedingungen erfüllt: (i) mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donoren oder (ii) mehr als 10 Wasserstoffbrücken-Akzeptoren, (iii) Molekulargewicht größer 500 D, (iv) berechneter Verteilungskoeffizient (CLogP)

---

<sup>1</sup>ADME: Resorption (engl. Absorption), Verteilung (engl. Distribution), Metabolisierung, Exkretion

größer als fünf. Nicht vergessen werden darf dabei, dass es sich um eine Negativ-Aussage handelt. Der Umkehrschluss (eine gute Resorption, wenn weniger als zwei der Bedingungen erfüllt werden) ist nicht automatisch möglich. Des Weiteren bezieht sich diese Regel nur auf Arzneistoffe und nicht auf Leitstrukturen. Die sind oft weniger komplex, um Spielraum für eine weitere Optimierung zu lassen [Hann et al., 2001; Oprea et al., 2001].

In den vergangenen Jahren sind erstaunliche Erfolge mit dem strukturbasierten Design von Wirkstoffen erzielt worden [Gane & Dean, 2000; Klebe, 2000; Shoichet et al., 2002]. So ist z. B. der Neuraminidasehemmer Zanamivir rational entworfen worden [von Itzstein et al., 1993]. Mittels eines virtuellen Screenings wurden subnanomolare Inhibitoren der Carboanhydrase gefunden [Grüneberg et al., 2001]. Im Falle der DNA Gyrase wurde in einem Hochdurchsatz-Screening bei Roche lediglich ein Hit gefunden [Böhm et al., 2000]. Daraufhin wurde in einem virtuellen Screening-Lauf nach kleinen Fragmenten gesucht. Die so gefunden Hits wurden mit großem Aufwand biophysikalisch validiert. Im anschließenden strukturbasierten Optimierungsprozess wurde eine Verbindung entworfen, die eine zehnfach höhere Affinität besitzt als ein derzeit in der Klinik angewandtes Antibiotikum.

Vor kurzem sind zwei Studien zum Vergleich der Hitraten aus Hochdurchsatz- und virtuellen Screening-veröffentlicht worden [Paiva et al., 2001; Doman et al., 2002].

In der einen Studie wurde im HTS-Experiment eine Bibliothek, die aus 400.000 Molekülen bestand, mit Protein Tyrosine Phosphatase-1B (PTP1B) getestet. Im Docking-Ansatz wurden 160.581 Verbindungen in das aktive Zentrum der Röntgenstruktur von PTP1B eingepasst. 365 der am besten bewerteten Verbindungen wurden anschließend auf Inhibition überprüft. Die Hitrate für diese 365 Moleküle war 1700fach höher als die der durch HTS gefundenen. Ein fairer Vergleich der Hitraten war in dieser Studie aber nicht möglich, weil für das HTS und den Docking-Ansatz unterschiedliche Bibliotheken zum Einsatz kamen [Doman et al., 2002].

In der anderen Vergleichsstudie wurde für das HTS und den Docking-Ansatz jeweils dieselbe Bibliothek verwendet [Paiva et al., 2001]. In diesem Fall war die Hitrate des Docking-Ansatzes 30fach höher als die Hitrate, die durch HTS erzielt wurde. Zudem wurden durch das Docking affinere Hits als durch das Hochdurchsatz-Screening gefunden.

Ursprünglich sind HTS und virtuelles Screening als unabhängige Verfahren betrachtet worden. Zur Zeit wird aber der synergistische Effekt dieser beiden Methoden dis-

kutiert [Böhm & Stahl, 2000; Good et al., 2000; Bajorath, 2002]. So können z. B. strukturbasiert kombinatorische Bibliotheken virtuell entworfen und durchmustert werden. Nur ein kleiner Teil der Moleküle wird dann tatsächlich synthetisiert und experimentell getestet. Umgekehrt können durch das HTS große Datensätze über Struktur-Wirkungsbeziehungen von Liganden gesammelt werden. Die Auswertung dieser Datensätze kann dann mit Methoden des computerunterstützten Wirkstoff-Designs erfolgen. Das Ziel ist es, dass durch die Synergie-Effekte in naher Zukunft schneller und kostengünstiger neue Arzneistoffe entwickelt werden können.

## 1.2 Aufgabenstellung

Auch wenn mittlerweile erstaunliche Erfolge mit dem strukturbasierten Design von Inhibitoren erzielt wurden, so müssen doch für jede Fragestellungen die Methoden und Vorgehensweisen neu etabliert werden.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde mit dem strukturbasierten Design von Inhibitoren der *Zymomonas mobilis* tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) begonnen [Grädler, 2000]. Ziel dieser Arbeit ist es, dieses Design fortzusetzen, wobei Methoden des computerunterstützten Wirkstoff-Designs und der experimentellen Proteinbiochemie zur Anwendung kommen sollen.

Zunächst soll das bestehende Testsystem zur Bestimmung der Bindungsaffinität verbessert werden. Dabei soll auf den Einsatz von radioaktiven Material verzichtet werden. Weiter soll durch den Austausch einer Aminosäure im aktiven Zentrum die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT in die der *S. flexneri* TGT, dem eigentlichen Zielmolekül, überführt werden. Dadurch sollen Rückschlüsse zum unterschiedlichen Verhalten der beiden homologen Proteine im Assay gezogen werden können.

Ausgehend von den Ergebnissen der vorangegangenen Arbeit sollen neue Leitstrukturen gefunden und optimiert werden. In Kooperation mit zwei synthetisch arbeitenden Arbeitskreisen (AK Bracher, LMU München, und AK Diederich, ETH Zürich) sollen weitere Liganden auf TGT-Inhibition getestet werden und durch Röntgenstrukturanalyse der Ligand-TGT-Komplexe Erkenntnisse für folgende Design-Zyklen gewonnen werden. Diese Erkenntnisse sollen dazu genutzt werden, um neue Inhibitoren zu finden bzw. bekannte zu optimieren.

In Kapitel 2 wird das biologische System, in dem die TGT eine Schlüsselstellung einnimmt, näher beschrieben. Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit werden in Kapitel 3 dargestellt und diskutiert. Kapitel 4 fasst die Ergebnisse der Arbeit zusammen und gibt einen Ausblick. Die verwendeten Methoden sind in Kapitel 5 aufgeführt.

## 2 Biologisches System

### 2.1 Bakterienruhr

Die Bakterienruhr ist eine Dickdarmerkrankung, welche durch verschiedene *Shigella*-Arten (Kapitel 2.2) hervorgerufen wird [Butler, 1996]. Sie geht mit starken Durchfällen und / oder Dysenterie<sup>1</sup> einher. Die Symptome sind blutig-schleimige Stühle bei andauerndem Stuhldrang und Bauchkrämpfen sowie durch Exotoxine bedingte allgemeine Störungen wie Fieber, Kreislaufschwäche und Exsikkose<sup>2</sup>. Die Erkrankung kann vor allem bei Kindern mit akuten, z. T. tödlichen, Komplikationen einhergehen. Dazu gehören akute Hypoglykämie, toxisches Megakolon, Sepsis und hämolytisch-urämische Syndrome.

Die Bakterienruhr ist weltweit endemisch. Jährlich kommt es zu etwa 160 Mill. Erkrankungen, wovon 99 % in den Entwicklungsländern auftreten. Vor allem immungeschwächte Personen und Kinder sind von der Erkrankung betroffen. Für über eine Million Betroffene pro Jahr, darunter über 700.000 Kinder, verläuft die Erkrankung tödlich [Kotloff et al., 1999].

Die Bakterienruhr wird hauptsächlich über kontaminierte Lebensmittel übertragen. Mangelnde Hygiene ist hierfür die Hauptursache. Das einzige Reservoir für Shigellen ist der Mensch, außerhalb des menschlichen Körpers können die Erreger nur kurze Zeit überleben. Shigellen sind hoch infektiös. 10 - 100 Organismen sind ausreichend, um die Krankheit ausbrechen zu lassen, weshalb auch die Gefahr ihres potenziellen Einsatzes als B-Waffe diskutiert wurde [Wartell et al., 2000].

Die Bakterien sind außerordentlich erfolgreich im Erringen plasmid-kodierter Antibiotika-Resistenzen. So sind inzwischen fast alle Erreger gegen Sulfonamide, Tetracycline, Ampicillin und Trimethoprim-Sulfamethoxazol resistent [Sack et al., 1997]. Die Resistenzentwicklung gegen das einzig noch wirksame Medikament Ciprofloxacin scheint kurz bevor zu stehen [WHO, 2000]. Zur Verhinderung des Ausbruchs der Erkrankung wird zur Zeit an der Entwicklung von Impfstoffen gearbeitet [WHO, 1997; Sansonetti, 1998]. Daneben scheint die Entwicklung neuer spezifischer Antibiotika auf Grund der vielen Resistenzen dringend geboten.

---

<sup>1</sup>Entzündliche Erkrankung des Dickdarms

<sup>2</sup>Körperwasserverluste

## 2.2 Shigellen

Shigellen sind gramnegative, unbewegliche, nicht begeißelte, sporenlose, fakultativ anaerobe Stäbchen, die taxonomisch pathogene Varianten des Darmbakteriums *Escherichia coli* darstellen [Hale, 1998]. Vier *Shigella* species können die Bakterienruhr verursachen: *S. dysenteriae* (16 Serotypen), *S. flexneri* (sechs Serotypen), *S. boydii* (8 Serotypen) und *S. sonnei* (ein Serotyp). *S. flexneri* und *S. sonnei* sind für das weltweite endemische Auftreten verantwortlich, wobei die erst genannte Art vorwiegend in den Entwicklungsländern vorkommt, die zuletzt genannte dagegen in der industrialisierten Welt. *S. dysenteriae* Serotyp 1 („Shiga bacillus“) verursacht vor allem wegen der Produktion des Shigatoxins, ein potentes Zytotoxin, Epidemien mit häufig tödlichem Ausgang in den Entwicklungsländern. *S. boydii* tritt lokal beschränkt auf Indien auf.

## 2.3 Molekulare und zelluläre Pathogenese der Bakterienruhr

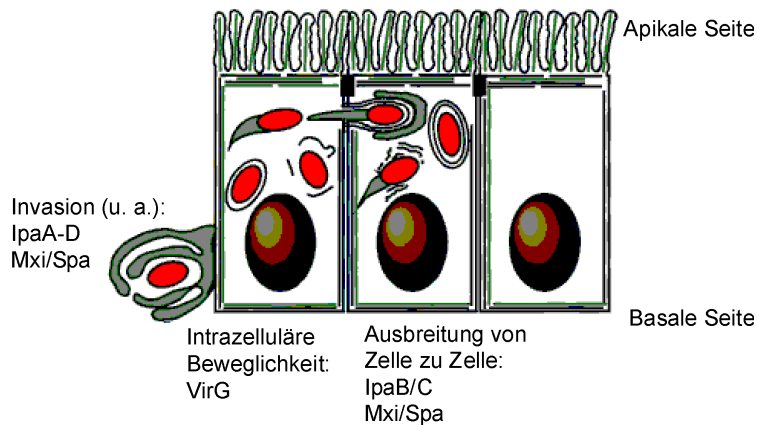
Shigellen besitzen die Fähigkeit, in die Darmschleimhaut einzuwandern und sich dort unentdeckt vom Immunsystem zu vermehren. Dies ist die Hauptursache der Erkrankung [Sansonettil, 2001a,b]. Die Pathogenese beruht in der frühen Phase der Infektion auf dem Zusammenspiel von drei Faktoren :

1. dem Durchwandern der Darmschleimhaut durch Eindringen in spezialisierte Darmepithelzellen (M-Zellen<sup>3</sup>),
2. der Invasion in Epithelzellen von der basalen Seite und
3. der Entzündungsantwort des Wirtes, die die Integrität der Darmschleimhaut zerstört und so die Invasion erleichtert.

Für diesen Vorgang sind eine Reihe von Virulenzfaktoren verantwortlich (Abb. 2.1). Die Gene hierfür liegen hauptsächlich auf einem 214 kb großen Virulenzplasmid.

---

<sup>3</sup>M-Zellen umschließen Lymphozyten. Sie sind vermutlich auf die Resorption antigener u. immunogener Substanzen spezialisiert.



**Abb. 2.1** Mechanismus der Epithelzelleninvasion sowie intra- und interzellulärer Kolonisation von *Shigella*. Abbildung aus Sansonetti [2001a]

Shigellen sind nicht in der Lage, von der apikalen Seite (dem Darmlumen zugewandte Seite) in Epithelzellen einzudringen. Um die Barriere der Darmschleimhaut zu überwinden, dringen sie deshalb in M-Zellen ein und wandern durch diese hindurch zur basalen Seite der Schleimhaut. Dort wird eine Pore, die aus einem Komplex aus IpaB- und IpaC-Proteinen besteht, in die Membran der Epithelzellen eingefügt. Durch diese Pore werden mit Hilfe eines Typ III-Sekretionsapparates, für den u.a. die *mxi*- und *spa*-Gene kodieren, Virulenz-Proteine, darunter IpaA und IpaD, in die Zelle geschleust. Dadurch wird eine massive Zytoskelettumlagerung in der Wirtszelle ausgelöst. Dabei entstehen Membranausstülpungen, die über dem Bakterium verschmelzen und es in einem makropinocytotischen Prozess internalisieren. Danach befindet sich das Bakterium in einer phagosomalen Vakuole, die jedoch lysiert wird. Das Bakterium bildet nun, ausgehend von einem der beiden Zellpole, einen F-Aktinschwanz, was dazu führt, dass es sich im Wirtszytosol vorwärts bewegt. Für diesen Vorgang ist das zelloberflächenexponierte VirG(= IcsA)-Protein notwendig. In den Zellen können sich die Shigellen so unbemerkt vom Immunsystem vermehren und von Zelle zu Nachbarzelle ausbreiten.

Des Weiteren werden Shigellen, sobald sie die basale Seite erreicht haben, von Makrophagen phagozytiert. Die phagozytierten Shigellen entkommen jedoch dem phagosomalen Kompartiment und induzieren in den Makrophagen durch Aktivierung der pro-apoptotischen Cysteinproteinase Caspase-1 deren programmierten Zelltod. Die aktivierte Caspase-1 führt jedoch nicht nur zur Apoptose, sondern prozessiert auch die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 zu ihren aktiven Formen. Dies ist zum Teil für die heftige Entzündung des Darmepithels verantwortlich, das durch Shigellen gemeinhin verursacht wird. Ein weiterer Vermittler der Entzündungsantwort ist IL-8,



das von den befallenen Epithelzellen selbst als Antwort auf die in die Wirtszelle gelangten bakteriellen Lipopolysaccharide sezerniert wird.

Durch diese inflammatorischen Zytokine werden chemotaktisch Granulozyten rekrutiert, die durch das Epithel wandern. Dadurch wird die Integrität des Epithels weiter zerstört und das Eindringen der Shigellen erleichtert.

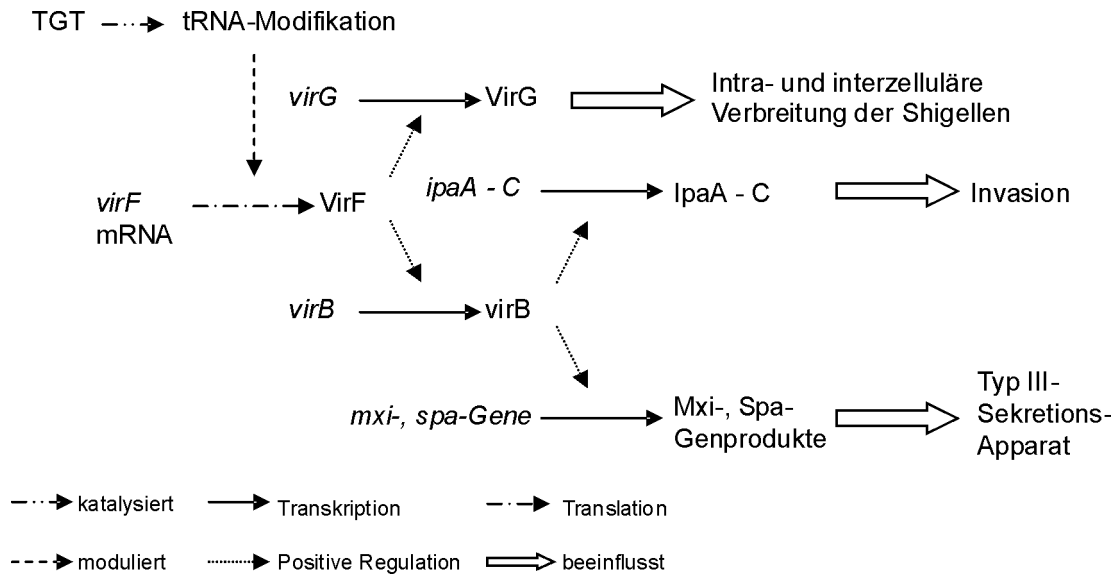
## 2.4 Die Rolle der tRNA-Guanin Transglykosylase in der Pathogenese

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, sind eine Reihe von Virulenz-Faktoren für die Pathogenität der Shigellen verantwortlich. Eine Schlüsselposition nimmt dabei VirF ein. VirF ist ein Transkriptionsfaktor, der positiv die Produktion von VirG reguliert [Sakai et al., 1988], welches wiederum an der intra- und interzellulären Ausbreitung des Pathogens beteiligt ist (Abb. 2.2). Des Weiteren reguliert VirF die Expression eines weiteren Transkriptionsfaktors, VirB [Adler et al., 1989], der wiederum die Produktion der Invasine IpaA - C und weiterer Pathogenitätsfaktoren ermöglicht. Dazu gehören *mxi*- und *spa*-Gen-Produkte, aus denen der Typ III-Sekretionsapparat aufgebaut ist [Parsot et al., 1995]. Demnach scheint VirF das übergeordnete Regulatorprotein zu sein, das für die Ausbildung des virulenten Phänotyps der Shigellen verantwortlich ist. Sinkt die Konzentration von VirF unter einen bestimmten Grenzwert, büßen die Shigellen weitgehend ihre Pathogenität ein [Durand et al., 2000].

Die Transkription der *virF*-Gens ist abhängig von der Wachstumstemperatur der Shigellen und der Superhelizität der DNA, die Translation zu VirF vom Vorhandensein modifizierter tRNA [Durand et al., 2000]. Voraussetzung für die Pathogenität der Shigellen ist, dass bestimmte tRNAs sowohl die hypermodifizierte Base Queuin in der *wobble position*<sup>4</sup> als auch 2-Methylthio-N<sup>6</sup>-isopentenyladenosin (ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A37) benachbart zum 3'-Ende des Antikodons enthalten. Demnach sind alle Enzyme, die an der Biosynthese der beiden modifizierten Basen sowie ihrem Einbau in die tRNA beteiligt sind, denkbare Angriffspunkte für Antibiotika, die die VirF-Konzentration senken und damit die Ausbildung des pathogenen Phänotyps der Shigellen verhindern.

Durch Mutationsstudien wurde diese Annahme gestützt. *S. flexneri* Mutanten, die entweder ein defektes *miaA*-Gen (beteiligt an der Biosynthese von ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A37) oder *tgt*-Gen

<sup>4</sup>Position in der tRNA (Nr. 34), in der besonders viele modifizierten Basen auftreten.



**Abb. 2.2 Rolle der TGT in der Pathogenität der Shigellen.** VirF ist ein übergeordnetes Regulatorprotein, das in der Ausbildung des virulenten Phänotyps der Shigellen eine wichtige Rolle spielt. Für die Translation der *virF*-mRNA sind modifizierte tRNAs notwendig. Das Enzym TGT ist an der Biosynthese einer solchen Basenmodifikation beteiligt.

(beteiligt an der Biosynthese von Queuin) enthalten, zeigen eine deutlich verminderte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp [Durand et al., 1994, 1997]. Eine *E. coli* Mutante, bei der das *miaA*-Gen ausgeschaltet wurde, zeigt verglichen mit dem Wildtyp eine deutlich reduzierte Wachstumsphase [Diaz et al., 1987], wohingegen eine *tgt*-Null-Mutation keinen Einfluss darauf hat [Noguchi et al., 1982]. Folglich sollte ein Inhibitor eines Enzyms der Queuosin-Biosynthese ein selektives Antibiotikum gegen Shigellenruhr darstellen, das die natürliche Darmflora nicht schädigt.

In Prokaryonten wird Queuin ausgehend von Guanin in mehreren Schritten synthetisiert (Abb. 2.3). Durch bisher unbekannte enzymatische Reaktionen entsteht zunächst  $\text{preQ}_1$  [Kuchino et al., 1976], das durch die tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) in die *wobble position* bestimmter tRNAs im Austausch gegen Guanin eingebaut wird [Okada & Nishimura, 1979]. Anschließend wird mittels S-Adenosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase (QueA) in einer S-Adenosylmethionin-abhängigen Reaktion eine substituierte Cyclopentylgruppe auf das N-Atom der tRNA-Aminomethylgruppe transferiert. Dabei entsteht Epoxyqueuosin (oQ, 7-((N-(2,3-Epoxy-4,5-cis-dihydroxycyclopent-1-yl)amino)methyl)-7-deazaguanosin) [Slany et al., 1993]. Im letzten Schritt wird in einer Coenzym abhängigen Reaktion oQ zu Queuosin (7-(((4,5-cis-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-yl)amino)methyl)-7-deazaguanosin) reduziert [Frey et al., 1988].

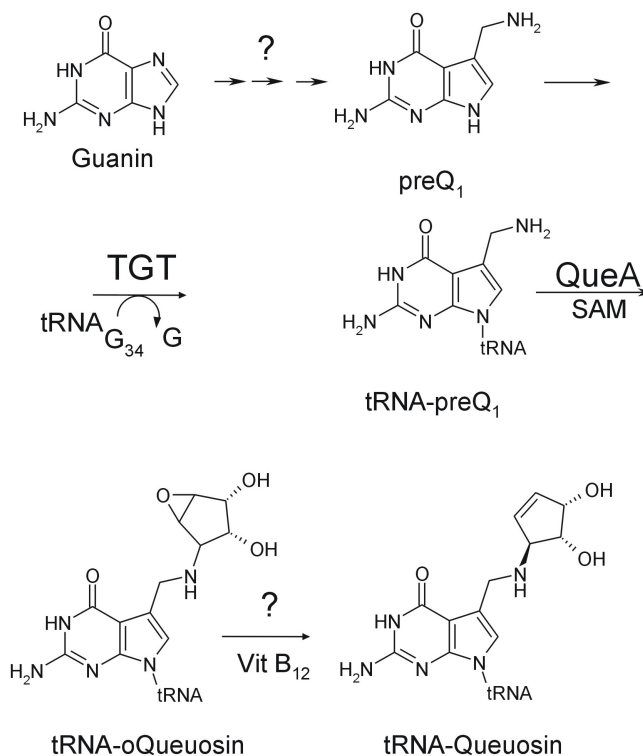


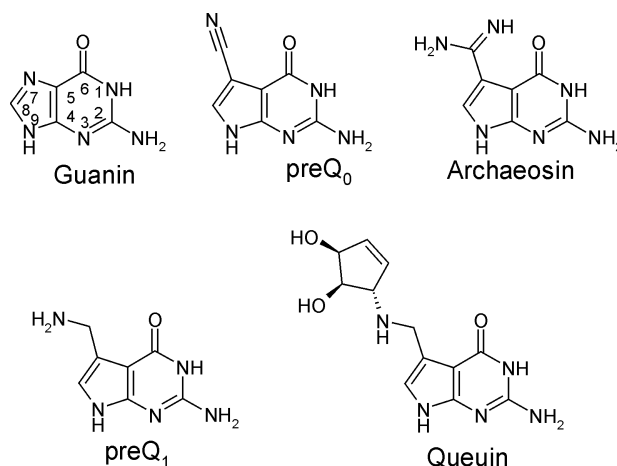
Abb. 2.3 Biosynthese von Queuosin.

Die Kristallstrukturen von zwei Enzymen dieses Stoffwechselwegs sind bisher bekannt. Die Röntgenstruktur von QueA wurde mit einer Auflösung von nur 3,0 Å bestimmt [Grimm, 2001]. Für einen strukturbasierten Design-Ansatz von Inhibitoren, wie er in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden sollte, ist sie deshalb bisher noch nicht geeignet. Die Struktur der TGT hingegen wurde mit einer Auflösung von 1,85 Å bestimmt [Romier et al., 1996b]. Sie bildet somit eine gute Grundlage für das Design von Wirkstoffen zur Behandlung der Shigellenruhr [Grädler et al., 2001].

## 2.5 Funktion der tRNA-Guanin Transglykosylase

Die tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT, EC 2.4.2.29) ist ein Schlüsselenzym der posttranskriptionalen Modifikation von tRNA. TGT katalysiert eine Basenaustauschreaktion. Diese verläuft über eine Spaltung der Guanin-N-Ribose-Bindung, ohne dass dabei das Phosphodiester-Rückgrat der tRNA gebrochen wird (für eine Übersicht siehe [Slany & Kersten, 1994] sowie [Romier et al., 1998]). In Prokaryonten und in Eukaryonten (mit Ausnahme der Hefen) führt die TGT-Aktivität letztendlich zu tRNAs, die die hypermodifizierte Base Queuin enthalten. Im Gegensatz dazu entsteht durch archae-

bakterielle TGT und Folgereaktionen tRNA, die die nahe verwandte Base Archaeosin (7-Formamidino-7-deazaguanin) enthält (Abb. 2.4).



**Abb. 2.4 Chemische Struktur von Guanin und verschiedenen 7-Deazaguanin-Derivaten**

Die TGTs aus den drei Reichen des Lebens unterschieden sich in der Substratspezifität bezüglich der tRNA und / oder der Base.

Prokaryontische tRNA-Guanin Transglykosylase katalysiert den Austausch des Queuin-Vorläufers preQ<sub>1</sub> (7-(Aminomethyl)-7-deazaguanin) gegen Guanin in der Position 34, der *wobble position*, von tRNAs mit der Antikodensequenz GUN (tRNA<sup>Asp,Asn,His,Tyr</sup>) (Abb. 2.3). Im Gegensatz dazu baut eukaryontische TGT direkt Queuin in die tRNA ein. Die archaebakterielle TGT unterscheidet sich von den beiden vorangegangenen sowohl im Basen- als auch im tRNA-Substrat. Diese TGT katalysiert die Basenaustausch-Reaktion von preQ<sub>0</sub> (7-Cyano-7-deazaguanin) gegen Guanin in Position 15 der D-Schleife zahlreicher tRNAs. Vermutlich wird preQ<sub>0</sub> über eine noch unbekannte Reaktionsfolge zu Archaeosin transformiert.

Neben ihren natürlichen Basen-Substraten akzeptieren die TGTs aus den unterschiedlichen Reichen zusätzliche Substrate (Tab. 2.1). Die geringste Substratspezifität besitzt die eukaryontische TGT. Sie akzeptiert neben ihrem physiologischen Substrat Queuin die natürlichen Substrate aller anderen TGT-Enzyme sowie Guanin. Die höchste Substratspezifität besitzt archaebakterielle TGT. Sie akzeptiert nur ihr eigenes natürliches Substrat preQ<sub>0</sub> und Guanin.

Die Basenaustauschreaktion von preQ<sub>1</sub> gegen Guanin verläuft vermutlich nach einem assoziativen Mechanismus über eine kovalente Zwischenstufe [Romier et al., 1996c; Kittendorf et al., 2001] (Abb. 2.5). Dabei greift zunächst die Carboxylatgruppe von

Tab. 2.1 Substratspezifität der TGTs aus den unterschiedlichen Reichen.

Enzym	Guanin	preQ <sub>0</sub>	preQ <sub>1</sub>	Queuin
archaebakterielle TGT	×	×	-	-
prokaryontische TGT	×	×	×	-
eukaryontische TGT	×	×	×	×

Asp102 (*Z. mobilis*-Nummerierung) nukleophil das Guanosin in der *wobble position* der tRNA am C1'-Atom an. Dabei wird Guanin freigesetzt und eine kovalente Bindung zwischen der Aspartat-Seitenkette und der Ribose ausgebildet. Im zweiten Schritt wird Asp102 gegen preQ<sub>1</sub> ausgetauscht. Dies führt zur preQ<sub>1</sub>-modifizierten tRNA. Unklar ist bislang, wie die erforderliche Deprotonierung von preQ<sub>1</sub> erfolgt.

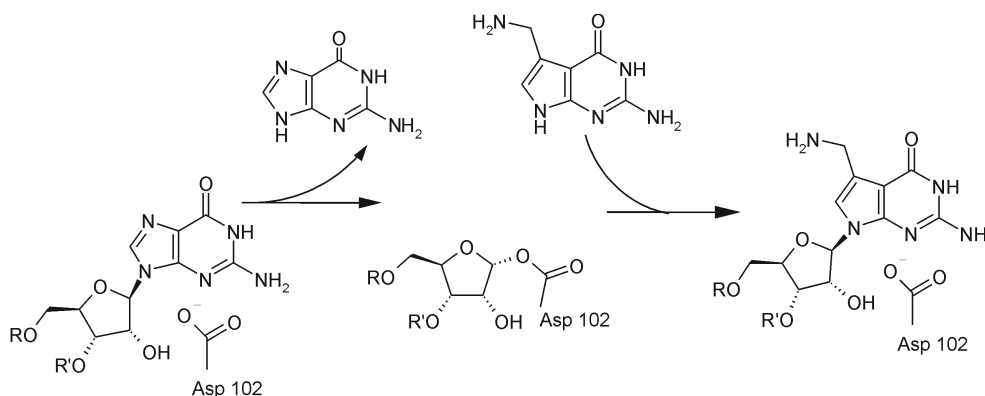


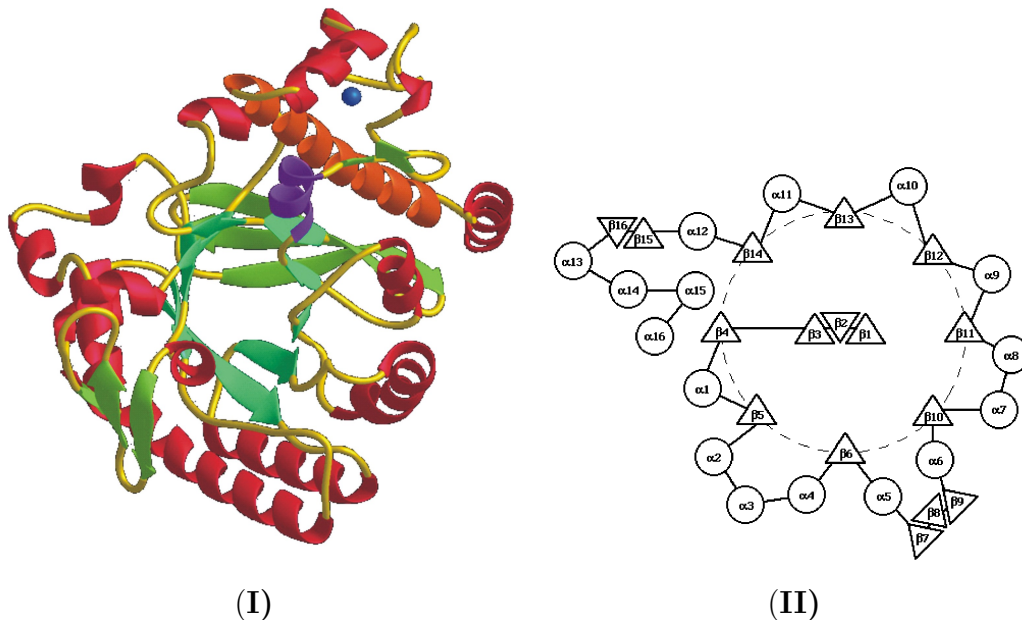
Abb. 2.5 Katalytischer Mechanismus der TGT. Die Reaktion verläuft nach einem assoziativen Mechanismus über eine kovalente Zwischenstufe.

## 2.6 Struktur der prokaryontischen TGT

Die einzige bisher bestimmte Kristallstruktur einer prokaryontischen TGT ist die von *Z. mobilis*. Diese TGT hat eine Sequenzhomologie von 52 % zur *S. flexneri* und *E. coli* TGT [Romier et al., 1997]. Die Bindetaschen der *Z. mobilis* TGT und *S. flexneri* TGT unterscheiden sich jedoch nur in einer einzigen Aminosäure. Anstelle von Tyr106 besitzt *S. flexneri* TGT dort ein Phenylalanin. Das macht das Enzym aus *Z. mobilis* zu einer geeigneten Plattform für das strukturbasierte Design von Inhibitoren, die in die Pathogenese der Bakterienruhr eingreifen [Grädler et al., 2001].

### 2.6.1 Sekundärstruktur der *Z. mobilis* TGT

Die Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT wurde 1996 mit einer Auflösung von 1,85 Å aufgeklärt [Romier et al., 1996b]. Das Enzym gehört zur Familie der  $(\beta/\alpha)_8$ -Fass-Enzyme („TIM-barrel“). Charakteristisch für diese Familie ist, dass das Fass aus acht parallelen  $\beta$ -Strängen geformt wird, wobei in der Primärstruktur aufeinander folgende  $\beta$ -Stränge auch im Fass direkt nebeneinander angeordnet sind. Je zwei aufeinander folgende  $\beta$ -Stränge werden durch einen Abschnitt miteinander verbunden, der eine  $\alpha$ -Helix enthält. Diese Helix kommt auf der Außenseite des Fasses zu liegen. [Farber & Petsko, 1990; Reardon & Farber, 1995]. Im Fall der *Z. mobilis* TGT folgen die acht  $\beta/\alpha$ -Einheiten nicht immer unmittelbar aufeinander, sondern es sind verschiedene Sekundärstrukturelemente eingefügt (Abb. 2.6).



**Abb. 2.6 Faltungsmuster der TGT.** (I) Ribbon-Darstellung der TGT. Die acht Stränge, die das Fass formen, sind grün eingefärbt. Das Zink-Ion ist als blaue Kugel dargestellt. Die Helix, die das Fass mit der Zink bindenden Domäne verbindet und vermutlich mit dem Phosphat-Rückgrat der tRNA wechselwirkt, ist violett markiert. (II) Schematische Darstellung der topologischen Struktur der TGT.  $\beta$ -Stränge sind als Dreiecke und  $\alpha$ -Helices als Kreise dargestellt. Der gestrichelte Kreis verbindet die acht Stränge, die das Fass formen. (Abbildungen entnommen von <http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/suck/tgt/tgt.html>)

Die Struktur beginnt am N-Terminus mit einem drei-strängigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, das die N-terminale Seite des Fasses verschließt. Das Fass bildet den zentralen Teil des Proteins. Die C-terminale Domäne enthält die vier Aminosäuren Cys318, Cys320,

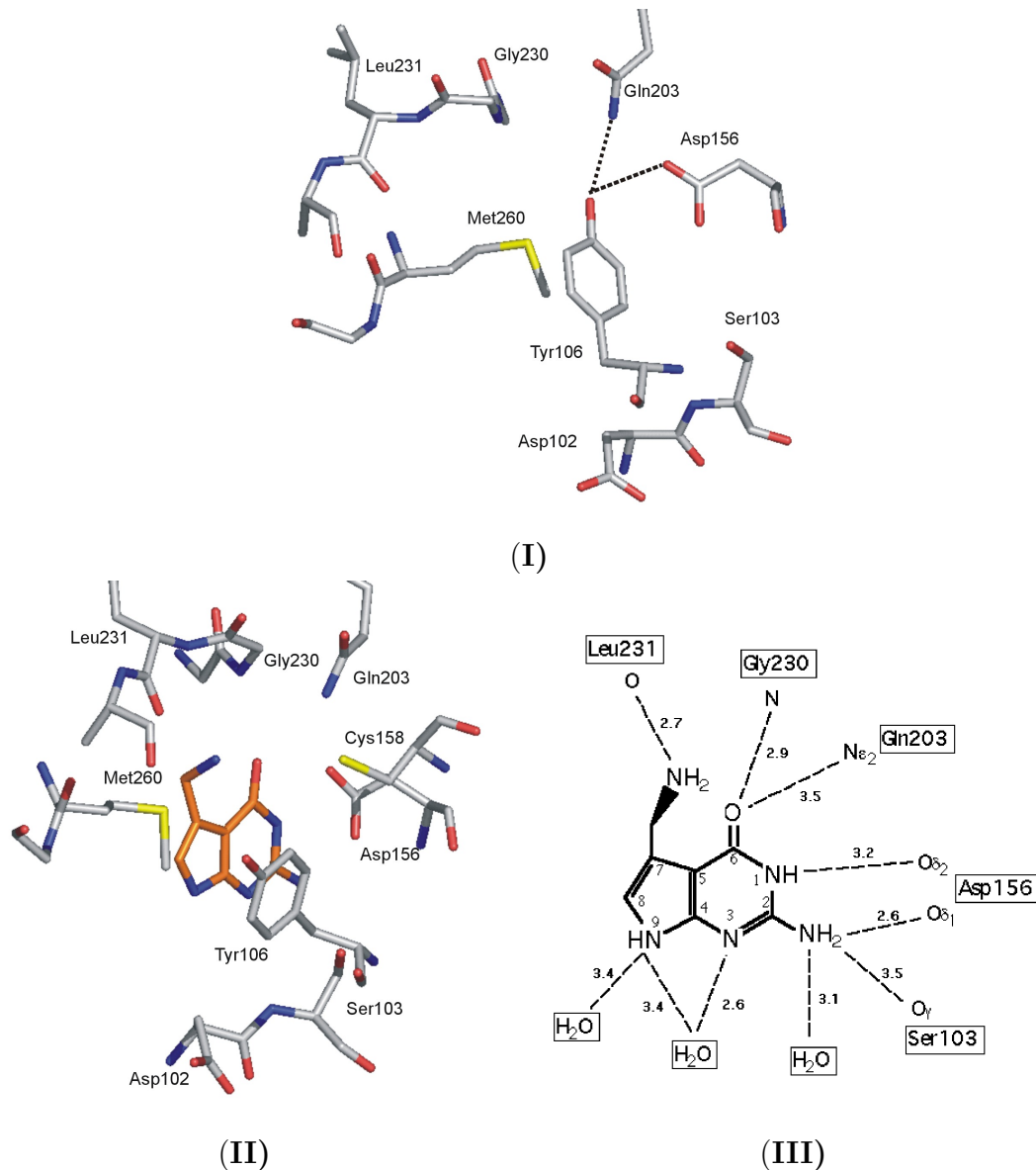
Cys323 und His349, welche ein Zinkion koordinieren. Die Zink bindende Domäne und das Fass sind über die Helix  $\alpha 12$  verbunden. Diese Helix stellt die terminale Helix des  $(\beta/\alpha)_8$ -Motivs dar. Sie enthält die basischen Aminosäuren Arg286 und Arg289, die vermutlich an der tRNA-Bindung beteiligt sind.

### 2.6.2 Aktives Zentrum der *Z. mobilis* TGT

Die Substrat-Bindetasche befindet sich auf der C-terminalen Seite des Fasses. In der apo-Struktur verschließt die Seitenkette von Tyr106 diese Tasche, indem sie Wasserstoffbrücken zu Asp156 und Gln203 ausbildet (Abb. 2.7.I). Durch die Substratbindung werden diese Wasserstoffbrücken gebrochen (Abb. 2.7.II und .III). Die Base interkaliert zwischen den Seitenketten von Met260 auf der einen Seite und Tyr106 auf der anderen Seite. Durch Wasserstoffbrücken zwischen der Seitenkette von Asp156 und der 1-NH und 2-NH<sub>2</sub>-Gruppe von preQ<sub>1</sub>, dem Amid von Gly230 sowie der Seitenkette von Gln203 zu O6 und dem Carbonylsauerstoff von Leu231 und der aliphatischen Aminogruppe wird das Substrat spezifisch erkannt. Alle diese Aminosäuren mit Ausnahme von Tyr106 sind in der *E. coli* und *S. flexneri* TGT konserviert. Anstelle von Tyr106 enthalten diese beiden Enzyme ein Phenylalanin.

### 2.6.3 tRNA Bindung durch *Z. mobilis* TGT

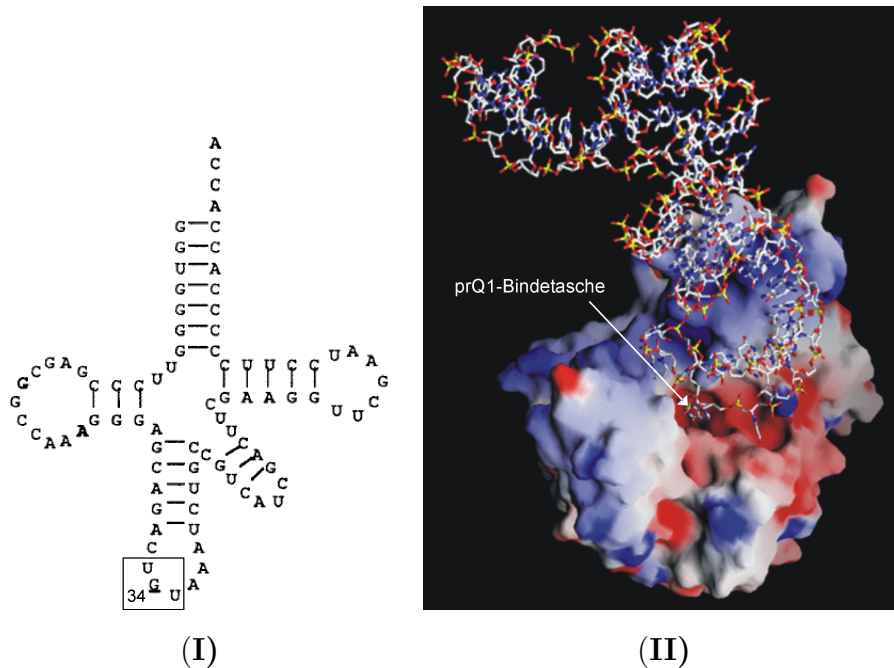
Das minimale tRNA-Motiv, dass von *E. coli* TGT erkannt wird, ist die Basenfolge UGU in einer tRNA-Schleife bestehend aus sieben Basen (Abb. 2.8.I) [Kung & Garcia, 1998]. Natürlich kommt diese Basenfolge an Position 33 - 35 bestimmter tRNAs vor. Eine konstruierte Antikodon-Schleife, die die Basenfolge an Position 34 - 36 enthält, wird aber ebenfalls als Substrat erkannt [Nonekowski & Garcia, 2001]. Alle weiteren Konstrukte dieser Studie, die die Basenfolge an anderen Positionen enthielten, waren inaktiv. Die natürliche tRNA, die UGU an Position 34 - 36 enthält, ist tRNA<sup>Thr</sup>. Diese wird von TGT nur erkannt, wenn sie statt U33 Cystein enthält. U33 ist in allen tRNAs invariant und beeinflusst die Konformation der Antikodon-Schleife. Dass tRNA<sup>Thr</sup> nur nach Austausch von U33 gegen Cystein erkannt wird, deutet darauf hin, dass die Konformation der Antikodon-Schleife die Erkennung von tRNA durch TGT beeinflusst.



**Abb. 2.7 Aktives Zentrum von *Z. mobilis* TGT.** (I) Apo-Form der TGT. Tyr106 verschließt die Tasche, indem seine Seitenkette Wasserstoffbrücken zu Asp156 und Gln203 ausbildet. (II, III) Bindungsmodus von preQ<sub>1</sub> im aktiven Zentrum der *Z. mobilis* TGT (II) Ausschnitt aus der Kristallstruktur (III) Schematische Darstellung; preQ<sub>1</sub> ist zwischen den Seitenketten von Met260 und Tyr106 interkaliert. Des Weiteren geht preQ<sub>1</sub> Wasserstoffbrücken zu Ser103, Asp156, Gln203, Gly230 und Leu231 sowie drei Wassermolekülen ein. (Abbildung III entnommen von <http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/suck/tgt/tgt.html>)

Nicht erkannte tRNAs enthalten, außer der nicht vorhandenen UGU-Sequenz, keine Elemente, die eine tRNA-Bindung verhindern [Kung et al., 2000]. Dies deutet darauf hin, dass für die spezifische Erkennung nur ein Teil der Antikodon-Schleife erforderlich ist.





**Abb. 2.8 (I) Unmodifizierte Volllängen-*E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup>.** TGT erkennt spezifisch die Basenfolge UGU. Guanin 34 wird gegen preQ<sub>1</sub> bzw. Queuin ausgetauscht. **(II) Modell der Wechselwirkung zwischen tRNA und *Z. mobilis* TGT.** Positiv geladene Bereiche sind blau eingefärbt, negativ geladene rot. Die TGT besitzt eine elektrostatische Bipolarität zwischen der positiv geladenen Zink bindenden Domäne und dem Zentrum des Fasses mit der negativ geladenen preQ<sub>1</sub>-Bindestelle. Die Basen der Antikodon-Schleife binden in der negativ geladenen Region. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat geht Wechselwirkungen mit der positiv geladenen Region ein. (Abbildung II entnommen von <http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/suck/tgt/tgt.html>)

Um den Reaktionsmechanismus der TGT näher zu untersuchen, wurde eine tRNA-Schleife konstruiert, die 2'-Desoxy-G an Position 34 enthielt [Nonekowski et al., 2002]. Dieses Konstrukt zeigt eine sehr hohe Aktivität mit TGT. Folglich ist die 2'-Hydroxylgruppe von G34 für die Katalyse und Affinität nicht erforderlich. Erstaunlicherweise werden von TGT sogar Schleifen erkannt, die komplett aus DNA bestehen, allerdings nur, wenn statt Thymidin 2'-Desoxyuridin verwendet wird.

Bis heute ist es nicht gelungen, die Struktur der TGT im Komplex mit tRNA aufzuklären. Auf der Basis von TGT-preQ<sub>1</sub> wurde von Romier et. al [Romier et al., 1996b] ein Modell der tRNA-Bindung an die TGT entwickelt (Abb. 2.8.II). Da preQ<sub>1</sub> spezifisch an der C-terminalen Seite des Fasses erkannt wird, muss auch die Antikodon-Schleife der tRNA in dieser Region binden. Diese Seite zeigt eine auffällige elektrostatische Bipolarität. Im Zentrum des Fasses befinden sich die negativ geladene preQ<sub>1</sub>-Bindetasche, während die Zink bindende Domäne positiv geladen ist. Die Struktur der tRNA<sup>Asp</sup>,

die der Kristallstruktur eines Aspartyl-tRNA-Synthetase-Komplexes entnommen wurde [Ruff et al., 1991], konnte so auf die TGT-Oberfläche gedockt werden, dass sich die vergrabene Fläche und die elektrostatische Komplementarität maximieren ließen. Das Modell zeigt Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Zink bindenden Domäne und dem Phosphat-Rückgrat der Antikodonschleife, wobei das Guanin-34 im Bereich der preQ<sub>1</sub>-Bindestelle interagiert.

## 2.7 Struktur der archaebakteriellen TGT

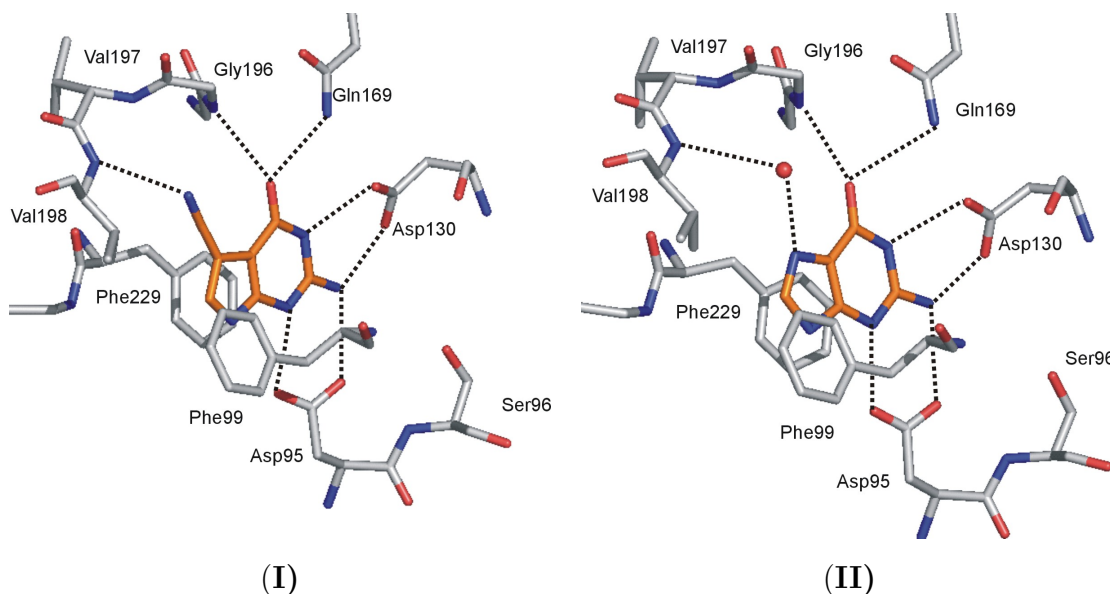
Das N-terminale Ende der archaebakteriellen TGT ist homolog zur *Z. mobilis* TGT aufgebaut [Romier et al., 1997]. Allerdings beträgt die Sequenzhomologie lediglich 25 %. Zusätzlich zu dieser katalytischen Domäne besitzen archaebakterielle TGTs eine C-terminale Region bestehend aus ca. 300 Aminosäuren. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich durch die unterschiedliche tRNA-Erkennung der beiden Enzyme bedingt. Prokaryontische TGT erkennt die Antikodon-Schleife bestimmter tRNAs, wohingegen archaebakterielle TGTs die tRNA in Position 15 der D-Schleife modifizieren [Ishitani et al., 2002].

Im Kontext dieser Arbeit ist die Bindetasche der archaebakteriellen TGT interessant.

### 2.7.1 Aktives Zentrum der *P. horikoshii* TGT

Die Kristallstruktur der *Pyrococcus horikoshii* TGT wurde vor Kurzem mit einer Auflösung von 2,3 Å bestimmt [Ishitani et al., 2002]. In der apo-Struktur ist im Gegensatz zur *Z. mobilis* TGT ein Teil der Bindetasche (Aminosäuren 97 - 106, entspricht 104 - 113 in der *Z. mobilis* TGT) ungeordnet. Nach der Bindung von Guanin oder preQ<sub>0</sub> geht dieser Bereich größten Teils in eine geordnete Struktur über.

Im Vergleich zur *Z. mobilis* TGT sind vier der sieben Aminosäuren, die eine direkte Wechselwirkung zum Liganden eingehen, identisch (Abb. 2.9). Der Aminopyrimidinon-Teil des Substrats bildet zu Ser98, Asp130, Gln169 und Gly196 dieselben Wasserstoffbrücken aus, wie sie auch in der *Z. mobilis* TGT gefunden werden (Ser103, Asp156, Gln203 und Gly230). Die beiden hydrophoben Aminosäuren Met260 und Tyr106 der *Z. mobilis* TGT sind gegen Phenylalanin 99 bzw 229 ausgetauscht. Die  $\pi$ -Wechselwirkung zum Substrat wird dadurch nicht verändert. Des Weiteren ist (Leu231 *Z. mobilis* TGT)



**Abb. 2.9 Aktives Zentrum der *P. horikoshii* TGT im Komplex mit preQ<sub>0</sub> (I) bzw. Guanin (II).** (I) Der Aminopyrimidinon-Teil des Substrats bildet zu Ser98, Asp130, Gln169 und Gly196 dieselben Wasserstoffbrücken wie in der *Z. mobilis* TGT aus. Die beiden hydrophoben Aminosäuren Met260 und Tyr106 der *Z. mobilis* TGT sind gegen Phenylalanin 99 und 229 ausgetauscht. Die Amid-Bindung zwischen Val197 und Val198 ist im Vergleich zur Peptidbindung zwischen Leu231 und Ala232 in der *Z. mobilis* TGT umgeklappt. Die NH-Gruppe von Val198 geht eine Wasserstoffbrücke zur Nitrilgruppe des Liganden ein. Die Seitenkette von Asp95 ist zum Liganden hingedreht. (II) Im Komplex mit Guanin tritt anstelle der Nitrilgruppe von preQ<sub>0</sub> ein Wassermolekül. Dieses vermittelt den Kontakt zwischen Val198 und dem Liganden.

gegen Val197 (*P. horikoshii* TGT) ersetzt. In diesem Bereich der Bindetasche tritt eine interessante Veränderung auf. Im Vergleich zur *Z. mobilis* TGT im Komplex mit preQ<sub>1</sub> [Romier et al., 1996b] ist die Peptidbindung zwischen Val197 und Val198 (Leu231 und Ala232 in *Z. mobilis* TGT) umgeklappt. Dadurch zeigt die Carbonylgruppe von Val197 im Gegensatz zur Carbonylgruppe von Leu231 aus der Bindetasche heraus. Die in der Sequenz folgende NH-Gruppe von Val198 ist in die Bindetasche gedreht. Das hat zur Folge, dass die Nitrilgruppe (Wasserstoffbrücken-Akzeptor) des natürlichen Substrats preQ<sub>0</sub> eine Wasserstoffbrücke zu Val198 eingehen kann. Die NH<sub>2</sub>-Gruppe (Wasserstoffbrücken-Donor) von preQ<sub>1</sub> hingegen geht eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Leu231 ein. In der Struktur der archaebakteriellen TGT im Komplex mit Guanin tritt an Stelle der Nitrilgruppe des preQ<sub>0</sub> ein Wassermolekül, welches den Kontakt zwischen Val198 und dem Liganden vermittelt (Abb. 2.9.II). Die Änderung in diesem Bereich ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass preQ<sub>1</sub> nicht als Substrat der archaebakteriellen TGT akzeptiert wird (vgl. Tab. 2.1)

Als weiterer Unterschied ist die Seitenkette des katalytischen Asp95 (Asp102 in *Z. mobilis* TGT) zum Liganden gewandt und geht eine gegabelte Wasserstoffbrücke zur exocyclischen Aminogruppe sowie zum N3 des Substrats ein.

## 2.8 Eukaryontische TGT

Eukaryontische TGT katalysiert den irreversiblen Austausch von Guanin in bestimmten tRNAs gegen Queuin (Kapitel 2.5). Im Gegensatz zu Prokaryonten können Eukaryonten Queuin nicht *De novo* synthetisieren, sondern müssen es mit der Nahrung aufnehmen. Die physiologische Rolle von Queuin ist weitgehend unklar. Es gibt Hinweise darauf, dass Queuin an Differenzierungs-, Proliferations- und Signal-Prozessen sowie an der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt ist [Björk & Rasmuson, 1998]. Von besonderem Interesse ist, dass tRNA von Tumorzellen in Bezug auf Queuin oft „unmodifiziert“ ist (zu wenig Queuin enthält). Andererseits erbrachte eine neuere Studie, dass die Expressionsraten von TGT in Tumorzellen höher als in normalen Zellen sind [Ishiwata et al., 2001].

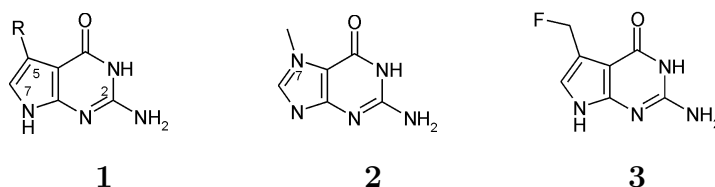
Die DNA-Sequenz der humanen TGT ist vor kurzem veröffentlicht worden [Deshpande & Katze, 2001]. Sie besitzt eine Sequenzidentität von 43 % zur *Z. mobilis* TGT. Zur Zeit werden Anstrengungen unternommen, das Protein zu überexprimieren und aufzureinigen. Ein Kristallstruktur ist folglich noch nicht bestimmt worden.

Basierend auf der Kristallstruktur von *Z. mobilis* TGT wurde von Romier et al. [1997] die Struktur der eukaryontischen TGT von *C. elegans* modelliert. Im aktiven Zentrum sind nur wenige Aminosäuren ausgetauscht. Keinen Einfluss auf die Erkennung von preQ<sub>1</sub> sollte der Austausch von Cys158 (*Z. mobilis* Nummerierung) gegen Valin haben (Abb. 2.7). Entscheidend hingegen ist, dass Val233 (*Z. mobilis* Nummerierung) gegen Glycin ersetzt ist. Dadurch wird die Bindetasche vergrößert, so dass der Cylopentendiol-Ring von Queuin gebunden werden kann.

## 2.9 Inhibitoren der TGT

### 2.9.1 Studien mit prokaryontischer TGT

In einer Studie wurde die Substratspezifität der *E. coli* TGT gegenüber einer Reihe von Guanin- bzw. Deazaguanin-Derivaten untersucht [Hoops et al., 1995b]. Das Enzym zeigte eine Toleranz gegenüber relativ kleinen Substituenten ( $R = H, CN, Me, CH_2NH_2, CH_2OH, CONH_2$ ) an der 5-Position des 2-Aminopyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-on-Gerüsts (**1**). Die aufgeführten Verbindungen können über ihre freie 7-NH-Gruppe an Position 34 der tRNA eingebaut werden und sind daher präziser als kompetitive Substrate zu bezeichnen.

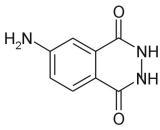
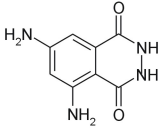
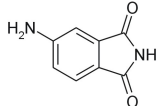
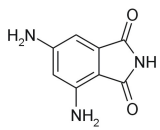
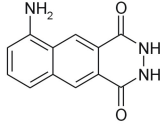
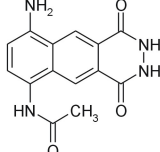
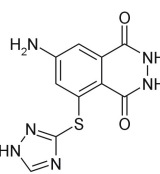
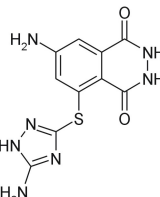


**Abb. 2.10 Inhibitoren der *E. coli* TGT.** Das Enzym zeigte eine Toleranz gegenüber relativ kleinen Substituenten ( $R = H, CN, Me, CH_2NH_2, CH_2OH, CONH_2$ ) an der 5-Position des 2-Aminopyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-on-Gerüsts. 7-Methylguanin (**2**) verhält sich im Gegensatz zu 2-Amino-5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-onen als kompetitiver Inhibitor. Verbindung **3** aktiviert *E. coli* TGT irreversibel.

Das natürliche Substrat preQ<sub>1</sub> zeigte erwartungsgemäß den kleinsten apparenten  $K_i$ -Wert ( $0,2 \mu M$ ) in dieser Serie. Auch preQ<sub>0</sub>, das natürliche Substrat archaebakterieller TGT, besitzt eine hohe Affinität ( $K_i = 0,8 \mu M$ ). Die niedrigste Affinität besitzt 2-Amino-5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-on ( $K_i = 506 \mu M$ ). Die beobachtete Abnahme der Affinitäten in dieser Serie wurde mit dem Einfluss der Substituenten in 5-Position auf den  $pK_a$ -Wert der 7-NH-Gruppe interpretiert. Im Einklang mit dem postulierten Mechanismus [Romier et al., 1996c; Kittendorf et al., 2001] fördert ein Elektronen ziehender Substituent in 5-Position die Deprotonierung der 7-NH-Gruppe und erleichtert damit die  $S_N2$ -Reaktion für den Basenaustausch [Hoops et al., 1995b]. 7-Methylguanin (**2**) verhält sich im Gegensatz zu 2-Amino-5-methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-onen als kompetitiver Inhibitor. Der apparente  $K_i$ -Wert ist mit  $2,1 \mu M$  etwas niedriger als der von Guanin ( $4,9 \mu M$ ) [Hoops et al., 1995b].

Das 5-Fluormethyl-Derivat von 2-Aminopyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-on (**3**) wurde als substratanaloger Inhibitor ( $K_i = 114 \mu\text{M}$ ) entwickelt [Hoops et al., 1995a]. Er inaktiviert die *E. coli* TGT irreversibel. Der Mechanismus dieser Inaktivierung sowie die im Protein befindliche nukleophile Gruppe, die offensichtlich unter Abspaltung eines Fluorids zur Ausbildung einer kovalenten Bindung mit **3** führt, sind nicht bekannt.

**Tab. 2.2 Rational entworfene Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT.**

Nr.	Struktur	$K_i [\mu\text{M}]$	Kristallstruktur
4		$8,3 \pm 0,4$	1,95 Å
5		$0,2 \pm 0,1$	1,85 Å
6		$4,8 \pm 0,3$	-
7		$2,1 \pm 1,4$	1,8 Å
8		$0,3 \pm 0,1$	1,95 Å
9		9,3	-
10		$54 \pm 14$	2,1 Å
11		$38 \pm 1$	1,4 Å

In einer anderen Studie wurde ein rationales Design von Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT durchgeführt [Grädler, 2000; Grädler et al., 2001].

Mit dem *De novo* Design-Programm LUDI [Böhm, 1992a] wurde **4** (Tab. 2.2) als Inhibitor mit einem  $K_i$ -Wert im unteren mikromolaren Bereich ( $8,3 \mu\text{M}$ ) gefunden. Die Kristallstruktur von **4** im Komplex mit *Z. mobilis* TGT wurde mit einer Auflösung von  $1,95 \text{ \AA}$  bestimmt. Der Ligand bildet dieselben Wasserstoffbrücken zum Protein wie das natürliche Substrat preQ<sub>1</sub> aus (Abb. 2.7). Ausgehend von dieser Kristallstruktur wurden die weiteren Inhibitoren **5** - **11** entworfen. Durch eine zusätzliche Aminogruppe (**5**) wurde die Affinität von **4** um den Faktor 40 gesteigert. Diese Aminogruppe geht Wasserstoffbrücken zu einem Wassermolekül ein. Durch Anfügen von geeigneten Resten (**10**, **11**) wurde versucht, die polare Tasche, die aus Asp280, Asp102 und Asn70 gebildet wird, zu füllen (Abb. 2.11). Allerdings konnte dadurch die Bindungsaffinität nicht gesteigert werden. Dies wurde durch repulsive Wechselwirkungen des ungeladenen Triazolrests, der an den Benzpyridazindion-Grundkörper angeknüpft wurde, erklärt. Dieser Rest war in den Kristallstrukturen der Komplexe ungeordnet. Außerdem führt die vermutlich repulsive Wechselwirkung zu einer Aufweitung der Wasserstoffbrücken zwischen der exocyclischen Aminogruppe und der Carbonylgruppe von Leu231. Daraus wurde geschlossen, dass diese Wasserstoffbrücke einen großen Beitrag zur Bindungsenergie gut bindender Liganden liefert.

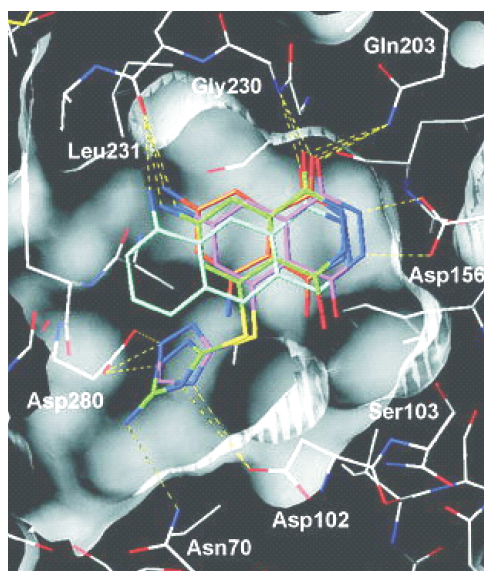


Abb. 2.11 Überlagerungen der Kristallstrukturen von *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **8** (grünblau), **10** (violett) und **11** (grün). (Abb. entnommen von Grädler et al. [2001]).

Eine Verbindung mit ankondensierten Phenylring (**8**) besitzt eine Aminogruppe in einer geeigneten Position, um die Wasserstoffbrücke zu Leu231 wieder auszubilden (Abb. 2.11). Ihr  $K_i$ -Wert liegt mit  $0,3 \mu\text{M}$  im submikromolaren Bereich.

Aus dieser Studie wurde geschlossen, dass die Orientierung einer Donorgruppe zu Leu231 ein wichtiges Kriterium für das Design weiterer Derivate von **4** ist, die eine geeignetere Wasserstoffbrücken-Geometrie im Bereich von Asp280, Asp102 und Asn70 ausbilden können.

### 2.9.2 Studien mit eukaryontischer TGT

Für eukaryontische TGT wurden bisher noch keine Inhibitoren entworfen. Es wurden aber Bindungsstudien mit eukaryontischer TGT aus verschiedenen Organismen mit substratähnlichen Inhibitoren durchgeführt.

Als Substrat der TGT aus Rattenleber wurden 6-Thioguanin und 8-Azaguanin beschrieben [Shindo-Okada et al., 1980].

Pterine konnten als kompetitive Inhibitoren der TGT aus Kaninchen-Erythrozyten identifiziert werden, wobei Pterin selbst eine hohe Affinität ( $K_i = 90 \text{ nM}$ ) *in vitro* zeigte [Jacobson et al., 1981]. Dagegen hatte Biopterin *in vivo* eine höhere Affinität als Pterin. Tetrahydropterin war wiederum affiner als Biopterin gegenüber TGT aus LM-Zellen (kultivierte Säugerzellen). Die unterschiedlichen Inhibitionseffekte wurden mit dem Oxidationszustand der Biopterine in Zusammenhang gebracht [Kersten, 1983].

In einer weiteren Studie wurden Purine und Pyrimidine als Inhibitoren der TGT als Inhibitoren der TGT aus Kaninchen Retikulozyten getestet [Farkas et al., 1984]. Es wurde gefunden, dass die  $\text{NH}_2$ -Gruppe in 2-Position und die Carbonylgruppe in 6-Position des 2-Aminopyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3*H*)-on-Gerüsts (**1**) essentiell für die Interaktion der Inhibitoren sind. Darunter zeigte 8-Azaguanin die höchste Affinität ( $K_i = 23 \text{ nM}$ ).



## 3 Ergebnisse und Diskussion

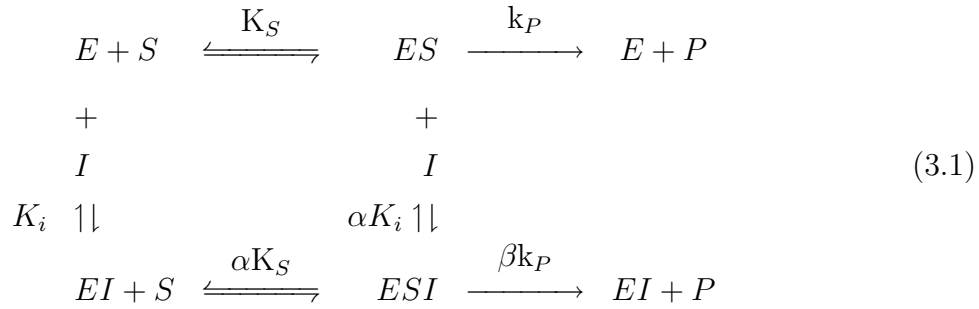
### 3.1 Ansätze zur Entwicklung eines Testsystems zur Bestimmung von Bindungskonstanten von Inhibitoren der TGT

Das Enzym TGT katalysiert den Basenaustausch von Guanin in der *wobble position* bestimmter tRNAs gegen die modifizierte Base preQ<sub>1</sub> (Kapitel 2.5, Abb. 2.5). Neben preQ<sub>1</sub> wird auch Guanin als Substrat von der TGT akzeptiert (Tab. 2.1). Diese Eigenschaft nutzt der derzeitige durchgeführte Assay aus (Kapitel 5.2.8.1, Curnow et al. [1993]). Dazu wird als freie Base [8-<sup>3</sup>H]-Guanin zugesetzt. Durch den Einbau von [8-<sup>3</sup>H]-Guanin in die tRNA wird diese radioaktiv markiert. Aus der Auftragung der Zunahme der Radioaktivität gegen die Zeit kann dann die Inhibitionskonstante bestimmt werden.

Wegen der Verwendung radioaktiver Materialien ist dieses Testsystem sehr kostspielig (ca. 20 € pro  $K_i$ -Wert-Bestimmung ohne Berücksichtigung der Kosten für die tRNA). Zudem ist der Assay sehr zeitintensiv. Nicht in die tRNA eingebautes [8-<sup>3</sup>H]-Guanin muss durch aufwändige Spülschritte entfernt werden. An einem Arbeitstag können so deshalb maximal sechs  $K_i$ -Werte bestimmt werden. Da die  $K_i$ -Werte eines Inhibitors mindestens zweifach bestimmt werden, können deshalb nur für drei Verbindungen pro Tag Affinitätsdaten ermittelt werden. Außerdem ist zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten tRNA erforderlich. Diese muss aufwändig *in vitro* transkribiert werden (Kapitel 5.2.7).

Des Weiteren ist eine reversible Enzymhemmung ein sehr komplexer Vorgang, in den mehrere Gleichgewichtskonstanten involviert sind (Gleichung 3.1) [Fersht, 1985; Copeland, 1996; Bisswanger, 2000]. In dieser Gleichung ist  $K_S$  die Gleichgewichtskonstante für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) aus dem freien Enzym (E) und dem freien Substrat (S),  $K_i$  die Dissoziationskonstante (auch als Inhibitionskonstante bezeichnet) des Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI) und  $k_P$  die Geschwindigkeitskonstante für die Produktbildung aus dem ES- oder Enzym-Inhibitor-Substrat(ESI)-Komplex. Der Faktor  $\alpha$  spiegelt den Einfluss des Inhibitors auf die Affinität des Enzyms für das Substrat und den Einfluss des Substrats auf die Affinität des Enzyms für den Inhibitor wider, der Faktor  $\beta$  die Änderung der Geschwindigkeit der Produktbildung durch den Inhibitor. Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten ist deshalb vom Inhibitionstyp

abhängig. Kompetitive Inhibitoren binden direkt an die Substratbindestelle des Enzyms. Bei einer kompletten kompetitiven Inhibition betragen die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  jeweils 0. Nicht-kompetitive Inhibitoren binden mit gleicher Affinität an den das freie Enzym und den Enzym-Substrat-Komplex. In diesem Fall ist  $\alpha = 1$  und  $\beta = 0$ . Inhibitoren dieses Typs binden an eine Stelle des Enzyms, die entfernt von der Substratbindestelle ist. Unkompetitive Inhibitoren binden wie nicht-kompetitive Inhibitoren nicht an die Substratbindestelle, aber nur an den ES-Komplex. Folglich ist  $\alpha > 1$  und  $\beta = 0$ . Des Weiteren gibt es so genannte gemischte Inhibitoren. Diese binden mit unterschiedlicher Affinität an das freie Enzym und an den ES-Komplex. In diesem Fall müssen sowohl die Werte für  $K_i$  als auch  $\alpha K_i$  bestimmt werden. Als seltener Inhibitionstyp sind partielle Inhibitoren bekannt. Bei diesem Typ läuft die Enzym-Reaktion auch mit gebunden Inhibitor ab, allerdings wesentlich langsamer. Hier ist  $0 < \beta < 1$ .



Im Falle der TGT ist das System noch weitaus komplizierter, da zwei Substrate (tRNA und preQ<sub>1</sub> bzw. Guanin) an der Reaktion beteiligt sind. Kinetische Studien mit dem kompetitiven Inhibitor 7-Methylguanin lassen darauf schließen, dass die tRNA-Bindung vor der Inhibitor-Bindung erfolgt (G. A. Garcia, persönliche Mitteilung). Allerdings können Liganden in Abwesenheit von tRNA in Kristalle eindiffundiert werden. Zudem bindet ein Teil der bekannten Liganden (z. B. **10** und **11**, Tab. 2.2 auf Seite 25) in einen Bereich in der Bindetasche, in den vermutlich auch die Ribose des Guanins in der *wobble position* der tRNA bindet. Deshalb sollten diese Liganden entweder in der Lage sein, die tRNA-Bindung zu verhindern oder die Bindung der tRNA an die TGT muss mit einer Konformationsänderung einhergehen.

Zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte der *Z. mobilis* TGT wird von einer kompetitiven Hemmung ausgegangen (Kapitel 5.2.8.2). Eine Bestimmung des Inhibitionstyp ist mit diesem Assay wegen der großen Fehler der Messwerte aber nicht möglich. Das Problem, dass ohne genaue Kenntnis des Inhibitionstyp eigentlich kein  $K_i$ -Wert bestimmt werden

kann, kann umgangen werden, wenn anstelle der Enzymreaktion nur die Bindung bzw. Dissoziation des Liganden gemessen wird.

Aus den eben angeführten Gründen sollte deshalb ein Bindungsassay für Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT entwickelt werden. Idealerweise sollte dieser Assay ohne tRNA auskommen.

### 3.1.1 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Bestimmung von Bindungskonstanten

Eine sehr empfindliche Methode, die oft zur Bestimmung von Bindungskonstanten verwendet wird, ist die Fluoreszenzspektroskopie [Ward, 1985; Eftink, 1997]. Dabei kann sowohl die durch die Ligandbindung hervorgerufene Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Rezeptors als des Liganden verfolgt werden. In dieser Arbeit wurden beide Strategien angewendet.

Die Fluoreszenz einer Verbindung kann durch ihr Anregungs- und Emissionsspektrum, ihre Quantenausbeute, ihre Anisotropie sowie die Lebensdauer beschrieben werden. Außerdem kann die Fluoreszenz einer Verbindung durch verschiedene Fluoreszenzunterdrücker („Quencher“, z. B. Elektronen-Akzeptoren, -Donoren, Energietransfer-Akzeptoren) vermindert werden. Bedingt durch diese Vielzahl an Parametern ist die Fluoreszenz stark umgebungsabhängig. Bei der Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor kommt es deshalb oft zu einer Änderung der Fluoreszenz. Falls diese Änderung groß genug ist, um gemessen werden zu können, kann daraus die Bindungskonstante berechnet werden.

#### 3.1.1.1 Änderung der Fluoreszenz des Proteins

Natürliche fluoreszierende Aminosäuren sind Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, wobei die Fluoreszenz-Quantenausbeute von Tryptophan am höchsten ist (0,20 im Vergleich zu 0,14 von Tyrosin und 0,04 von Phenylalanin). Die Tryptophan-Fluoreszenz kann mit Licht der Wellenlängen 280 - 295 nm angeregt werden. Die Emission erfolgt je nach Umgebung der Aminosäure von 308 nm für vergrabene Tryptophane bis zu 350 nm für Wasser zugängliche Tryptophan-Reste in ungefalteten Proteinen. Durch die Bindung eines Liganden in der Nähe dieser fluoreszierenden Aminosäuren wird

deren Mikroumgebung verändert, was wiederum Auswirkungen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hat.

In der Bindetasche der *Z. mobilis* TGT befindet sich Tyr106 (Abb. 2.7 auf Seite 18). In der apo-Form verschließt die Seitenkette dieser Aminosäure die Bindetasche durch Wasserstoffbrücken zu Asp156 und Gln203. Nach der Ligandbindung werden diese Wasserstoffbrücken geöffnet. Der Aromat von Tyr106 geht dann eine  $\pi$ -Wechselwirkungen zum Liganden ein. Dadurch wird die direkte Umgebung des Tyrosin durch die Bindung stark verändert. Dies geht mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften einher. Allerdings ist die Quantenausbeute von Tyrosin geringer als die von Tryptophan. Da die *Z. mobilis* TGT vier Tryptophane enthält, würde eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von Tyrosin vermutlich im Rauschen untergehen. Aus diesem Grund wurde in einer vorangegangenen Arbeit Tyr106 zu Tryptophan mutiert [Grädler, 2000]. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass die Y106W-Variante der TGT ähnliche kinetische Parameter wie das Wildtyp-Enzym besitzt.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Bindungskonstanten von Inhibitoren der TGT mit diesem mutierten Protein zu bestimmen. Dazu wurde sowohl der Ligand mit dem Enzym titriert als auch umgekehrt. In beiden Fällen konnte keine Änderung der Fluoreszenzintensität gemessen werden.

Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Seitenkette von Trp106 im Gegensatz zur Seitenkette von Tyr106 sowohl vor als auch nach der Ligandbindung keinen definierten Bindungsmodus einnimmt [Grädler, 2000]. Demnach ist die Umgebungsänderung dieser Aminosäure bei der Bindung geringer als ursprünglich erwartet. Zudem besitzt die Y106F-TGT zusätzlich zum mutierten Trp106 noch vier weitere Tryptophane. Die maximale Änderung beträgt also etwa 25 % vom Ausgangswert. Außerdem besitzen alle bekannten Liganden ein aromatisches System. Das führt dazu, dass sie selbst bei der Anregungswellenlänge des Tryptophans Licht absorbieren. Dieser so genannte „innere Filter-Effekt“ muss rechnerisch oder experimentell ausgeglichen werden [Birdsall et al., 1983]. Hier sowieso nur ein kleiner Unterschied in der Fluoreszenzänderung zu erwarten war, kann es sein, dass das Messsignal im Rauschen untergegangen ist.

Es ist auch denkbar, dass unter den verwendeten Bedingungen keine Bindung stattfindet. Es wurde zwar derselbe Puffer wie bei den kinetischen Messungen verwendet (Kapitel 5.2.8.2), aber keine tRNA zugesetzt. Bis heute ist nicht geklärt, ob vor der Ligandbindung zunächst tRNA gebunden haben muss oder ob der Ligand auch ohne tRNA ohne Affinitätsverlust bindet. Das Absorptionsmaximum von tRNA liegt bei 260 nm. Da diese im Überschuss zugesetzt werden muss, ist die Absorption der tRNA

bei 280 nm so hoch, dass die durch den inneren Filter-Effekte die Proteinfluoreszenz komplett gelöscht wird. Deshalb kann durch Messung der Proteinfluoreszenz der Einfluss der tRNA auf die Bindung nicht untersucht werden.

### 3.1.1.2 Änderung der Fluoreszenz des Liganden

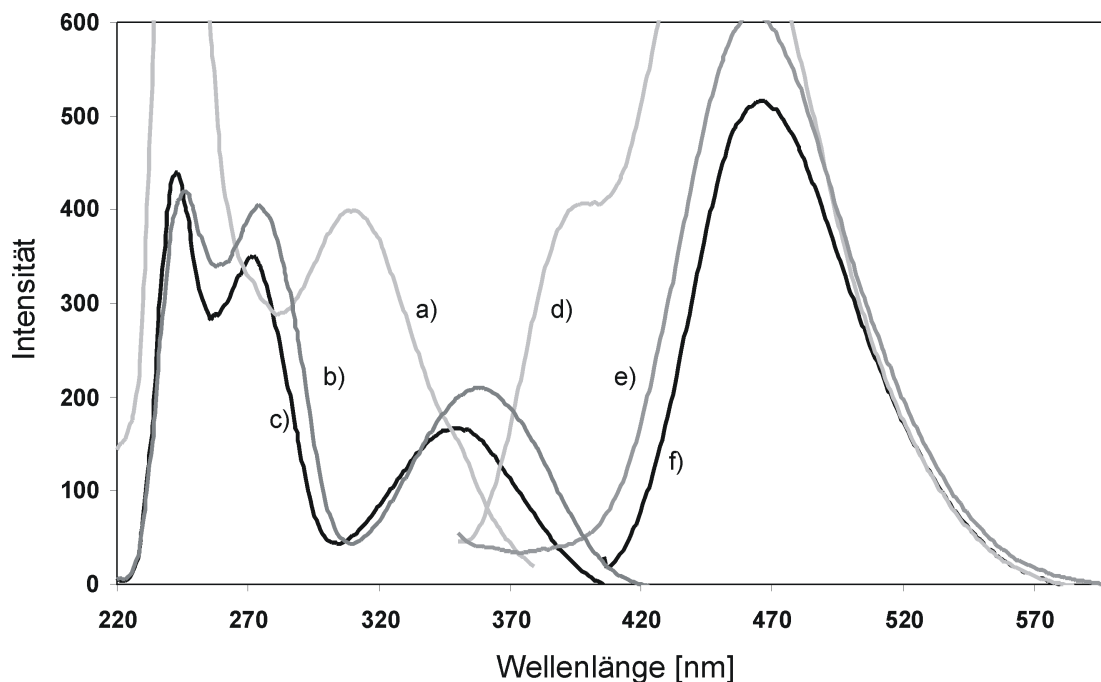
Aus den selben Gründen wie auf Proteinseite kann es auch bei der Bindung eines Liganden zur Änderung dessen Fluoreszenz kommen. Ist der  $K_d$ -Wert eines fluoreszierenden Liganden bekannt, so kann durch eine Verdrängungstitration dieses Liganden durch einen (nicht fluoreszierenden) Liganden mit unbekannten  $K_d$ -Wert dessen Bindungskonstante ermittelt werden (siehe z. B. Epps et al. [1999]).

Der Grundkörper der in Kapitel 3.5 vorgestellten Chinazolinone fluoresziert. Verbindung **56** (Tab 3.14 auf Seite 89) besitzt Anregungsmaxima bei 240, 270 und 360 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 460 nm (Abb. 3.1). Um einen inneren Filter-Effekt durch TGT zu vermeiden (Absorption bei ca. 280 nm), wurde für die Messungen mit diesem Liganden eine Anregungswellenlänge von 360 nm gewählt. Aber auch hier konnte nach Titration des Enzyms mit Ligand und vis versa keine Änderung der Fluoreszenz gemessen werden. Die Anregungswellenlänge von 360 nm erlaubte es, dass den Messungen tRNA zugefügt werden konnte. Aber auch dies hatte keinen Einfluss auf die Fluoreszenz.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Änderung der Fluoreszenz relativ klein ist und daher im Rauschen untergeht. Deshalb wurde an den Chinazolinon-Grundkörper ein Fluorophor angeknüpft, der sensibel auf Umgebungsänderungen reagieren sollte.

Ein bekannter sehr kleiner Fluorophor ist N-Methylantranilsäure (MANT, Abb. 3.2) [Molecular-Probes]. Das Anregungsmaximum dieser Verbindung beträgt 356 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 448 nm. Nach der Bindung an ein Protein nimmt die Fluoreszenzquantenausbeute zu und das Emissionsmaximum wird um 10 - 20 nm in den kürzer welligen Bereich verschoben.

Modellierungen mit MOLOC [Moloc] haben jedoch gezeigt, dass ein Chinazolin, an das der MANT-Rest angebracht worden ist, vermutlich nicht das aktive Zentrum der TGT binden kann. Die N-Methylgruppe würde wahrscheinlich aus sterischen Gründen stören. Deshalb wurde auf sie verzichtet. Die von E. Meyer (ETH Zürich) synthetisierte Verbindung (**12**, Abb 3.2) besitzt einen  $K_i$ -Wert von  $1,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . Die Inhibitionskonstante

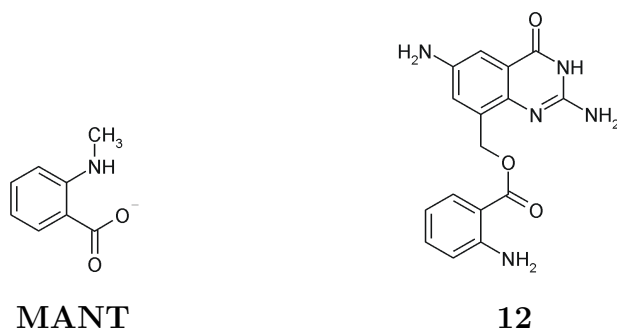


**Abb. 3.1** Fluoreszenzspektren von **12** (Abb.3.2) und **56** (Tab. 3.14 auf Seite 89). a - c) Anregungsspektren; d - f) Emissionsspektren a) Anregungsspektrum von **12**, gemessen bei einer Emissionswellenlänge von 390 nm (Slit 5 und 10 nm). b), c) Anregungsspektren von **56** (b) und **12** (c), gemessen bei einer Emissionswellenlänge von 456 nm (Slit 3 und 5 nm). b) Emissionsspektrum von **12**, gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm (Slit 5 und 10 nm). b), c) Emissionsspektren von **56** (b) und **12** (c), gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm (Slit 5 und 10 nm). Die Fluoreszenzeigenschaften des Anthranilsäureresters von **12** überlagern sich mit denen des Chinazolinon-Grundkörpers. Die Fluoreszenzintensität der Anthranilsäureresters ist geringer als die des Chinazolinon-Grundkörpers.

fällt damit in einen für einen Verdrängungsassay akzeptablen Bereich. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von **12** haben aber ergeben, dass die Fluoreszenzintensität der Anthranilsäure geringer ist als die des Chinazolinon-Grundkörpers (Abb. 3.1). Die vorteilhaften Eigenschaften der Anthranilsäure werden deshalb von den Fluoreszenzeigenschaften des Grundkörpers überdeckt. Auch mit dieser Verbindung konnte folglich keine TGT-Bindung gemessen werden.

Eine mögliche Alternative wäre es, den MANT-Fluorophor an einen anderen Grundkörper (Kapitel 3.4 und 3.7) anzufügen, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich nicht mit denen des MANT-Restes überlagern.

Anstelle eines anderen Grundkörpers könnte auch ein anderer Fluorophor verwendet werden. Allerdings sind andere häufig für solche Zwecke eingesetzte Fluorophore (z. B. Fluorescein oder BODIPY) sterisch sehr anspruchsvoll, so dass zwischen Grundkörper



**Abb. 3.2** N-Methylantranilsäure (MANT) und die fluoreszenzmarkierte Chinazolinon-Verbindung **12**.

und Ligand ein ausreichend langes Zwischenstück („Spacer“) angebracht werden muss. Dies geht vermutlich mit einem erhöhten  $K_i$ -Wert des fluoreszenzmarkierten Liganden einher.

### 3.1.2 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-spektroskopische Untersuchungen

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (SPR-Spektroskopie) ist eine relativ neue Technik zur zeitaufgelösten Messung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen [Rich & Myszka, 2000]. Dabei wird der eine Bindungspartner auf einen Chip, der mit einer Goldfolie beschichtet ist, aufgebracht und der andere Partner darüber gespült. Durch die Bindung des mobilen Partners an die immobilisierte Komponente ändert sich der Brechungsindex der Totalreflexion der Lösung in der Nähe der Goldfolie. Die Bindung kann deshalb über die Änderung der Reflexion eines Lichtstrahles an der Goldfolie detektiert werden.

Diese Methode hat den Vorteil, dass sie sehr schnell arbeitet. Zudem kann dadurch die Assoziation von der Dissoziation getrennt gemessen werden, so dass die kinetischen Parameter einer Wechselwirkung zweier Moleküle bestimmt werden können.

Das SPR-Signal ist proportional zur der Masse des Analyten, der mit dem zuvor auf der Folie immobilisierten Bindungspartner wechselwirkt. Standardmäßig wird deshalb der Bindungspartner mit dem niedrigeren Molekulargewicht auf der Goldfolie immobilisiert. Durch die Verbesserung der Sensitivität der Methode ist es mittlerweile auch möglich, unter bestimmten Umständen das schwerere Molekül (z. B. ein Protein) zu

immobilisieren und die Wechselwirkungen mit einem kleinen Liganden in der mobilen Phase zu messen [Markgren et al., 1998, 2000; Karlsson et al., 2000].

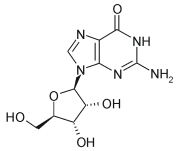
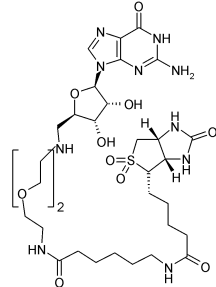
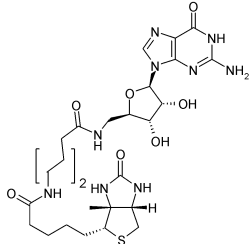
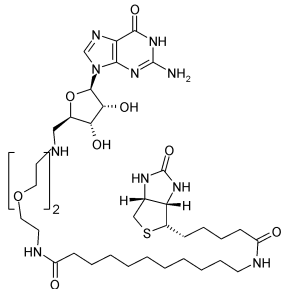
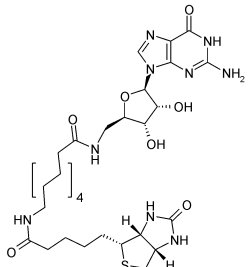
Von Usami et al. [2002] wurde ein Testsystem zur Messungen der Bindung von Liganden an den Estrogen-Rezeptor entwickelt, das auf der SPR-Spektroskopie beruht. Dazu wurde Estrogen auf einem Chip immobilisiert. Über diesen Chip wurde eine Lösung, die den Estrogen-Rezeptor sowie den Analyten in verschiedenen Konzentrationen enthält, gespült. Aus den so erhaltenen Sensogrammen konnten die  $K_d$ -Werte der Liganden ermittelt werden.

In Anlehnung an dieses Testsystem wurde versucht, einen Bindungsassay für *Z. mobilis* TGT aufzubauen. Dazu sollte ebenfalls ein Ligand auf einem Goldchip mit einem geeignetem Anker („Linker“) immobilisiert werden. Als Ligand wurde Guanosin gewählt. Guanosin ist ein Baustein der tRNA. Bestimmte tRNAs, die Guanin in der *wobble position* enthalten, sind Substrate der TGT (Kapitel 2.6.3). Vermutlich bindet dieses Guanin in dieselbe Bindetasche wie preQ<sub>1</sub>. Bisher ist es nicht gelungen, die Struktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit Guanin, Guanosin, Guanosinmonophosphat oder tRNA aufzuklären. Deshalb ist der Bindungsmodus des Guanins, der Ribose sowie der daran angeknüpften Phosphatgruppen nicht bekannt. Modellierungen in MOLOC haben aber gezeigt, dass die Phosphatgruppen vermutlich aus der preQ<sub>1</sub>-Bindetasche herausragen. In der tRNA sind die 3'- und 5'-OH-Gruppen der Ribose mit Phosphatgruppen verestert. Diese beiden Position eignen sich deshalb, um über einen „Spacer“ einen „Linker“ anzubringen. Eine Synthese zum Anbringen eines biotinylierten „Linkers“ an die 5'-Position von Adenosin-Derivaten wurde von Golisade et al. [2001] beschrieben. Mit dem Biotinyl-Rest kann die Verbindung dann auf einen kommerziell erhältlichen mit Streptavidin beladenen Goldchip über die sehr affine Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung aufgebracht werden.

Analog zu dieser Synthese wurden von C. Herforth (Arbeitsgruppe Prof. A. Link, Philipps Universität Marburg) Derivate des Guanosins synthetisiert (Tab. 3.1). Durch die Lage der Bindetasche und der Form der TGT bedingt, muss der Abstand zwischen Guanosin und Biotin mindestens 14 Å betragen, um einen sterischen Konflikt zwischen dem auf dem Chip immobilisierten Streptavidin und der TGT zu vermeiden (Abb. 3.3). Die „Linker“ der synthetisierten Guanosin-Derivate haben eine Länge von ca. 14 (**14**), 18 (**15**), 24 (**16**) und 23 Å (**17**). Durch die „Linker“ wird die Affinität dieser Verbindungen zur TGT nicht wesentlich beeinflusst. Im Vergleich zu Guanosin (**13**,  $K_i = 5,0 \mu\text{M}$ ) sind die  $K_i$ -Werte mit  $K_i = 7,6 - 13 \mu\text{M}$  nur leicht erhöht.

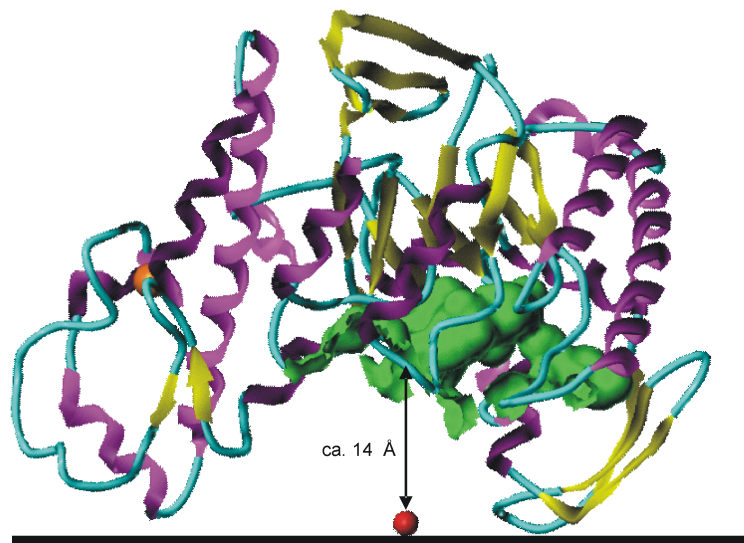


Tab. 3.1 Liste der biotinmarkierten Guanosin-Derivate.

Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
13		$5,0 \pm 3,1$	16		$13 \pm 2$
14		$7,6 \pm 0,1$	17*)		$9,3 \pm 2,8$
15		$11 \pm 7$			

\*) Diese Verbindung enthält ein Gemisch aus Biotin und Biotinsulfoxid.

Verbindung **15** wurde erfolgreich auf einen Streptavidin-Chip von BIAcore aufgebracht. Es konnte aber über einen Zeitraum von 30 Minuten keine Bindung der TGT beobachtet werden. Um zu testen, ob eventuell der „Linker“ zu kurz gewählt wurde, wurde versucht, die Verbindung mit dem längsten „Linker“ in dieser Serie (**17**) auf einen Chip aufzubringen. Dies glückte leider nicht. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Verbindung z. T. Biotinsulfoxid anstelle von Biotin enthält. Dieses besitzt eine niedrigere Affinität zu Streptavidin als Biotin.



**Abb. 3.3** Um einen sterischen Konflikt zwischen dem auf dem Chip immobilisierten Streptavidin und der TGT zu vermeiden, muss die Länge des „Linkers“ mindestens 14 Å betragen.

### 3.1.3 Zusammenfassung und Ausblick

Der bisher verwendete Assay beruht auf dem Einsatz von radioaktiv markiertem Guanin. Dadurch ist er sehr kostspielig und zeitaufwändig. Zudem wird tRNA benötigt. Deshalb sollte ein alternatives Testsystem, das möglichst ohne tRNA auskommt, entwickelt werden.

Sowohl mit Fluoreszenz- als auch mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-spektroskopischen Methoden ist es bisher nicht gelungen, die Bindung von Liganden an die TGT zu messen.

Im Falle der Fluoreszenz-Untersuchungen kann dies darauf zurückgeführt werden, dass bisher noch kein geeigneter fluoreszenzmarkierter Ligand gefunden wurde. Der hier verwendete Fluorophor (Anthranilsäure) hat den Vorteil, dass er sehr klein ist und deshalb gut in die Bindetasche der TGT passt. Allerdings überlappt sein Fluoreszenzspektrum zu stark mit dem des verwendeten Chinazolinon-Grundkörpers, so dass keine Fluoreszenzunterschiede nach der Bindung gemessen werden konnten. Andere oft verwendete Fluorophore haben den Nachteil, dass sie relativ groß sind. Werden diese an einen Liganden angeknüpft, geht das vermutlich mit einer unerwünschten Verminderung der Affinität einher.

Für SPR-spektroskopische Untersuchungen konnte das mit Biotin markierte Guanosin-Derivat **15** auf einen BIAcore-Chip aufgebracht werden. Allerdings konnte auch hier keine Bindung mit der TGT detektiert werden. Um eine Aussage treffen zu können, ob durch SPR-Untersuchungen mit Guanosin-Derivaten eine TGT-Bindung prinzipiell messbar ist, müssen weitere „Linker“ getestet werden, bzw. die vorhandenen „Linker“ mit Biotin anstelle von Biotinsulfoxid markiert werden.

Zudem ist die Frage zu klären, ob das Ziel, einen tRNA-freien Assay zu entwickeln, überhaupt theoretisch machbar ist. Nicht eindeutig geklärt ist, ob die tRNA-Bindung vor der Bindung des Inhibitors erfolgen muss. Um dies näher zu untersuchen, sollten entweder isothermale titrationskalorimetrische (ITC) oder weitere SPR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Für die SPR-spektroskopischen Untersuchungen bietet es sich an, tRNA(-Fragmente) zu immobilisieren und die TGT-Bindung an diese zu messen. Falls durch die Ligandbindung die tRNA-Bindung unterdrückt wird, könnte auch darauf aufbauend ein neues Testsystem entwickelt werden.

## 3.2 Mutationsstudie

Ziel dieser Arbeit war es, auf der Struktur der TGT basierend Inhibitoren zu entwerfen, da dieses Enzym ein interessantes Zielmolekül in der Pathogenese der Bakterienruhr darstellt (Kapitel 2.4). Bis heute ist es aber nicht gelungen, TGT aus Shigellen zu kristallisieren. Es sind jedoch die Kristallstrukturen von TGTs aus zwei anderen Organismen bestimmt worden, nämlich die der prokaryontischen TGT aus *Z. mobilis* [Romier et al., 1996b] sowie die der archaebakteriellen TGT aus *P. horikoshii* [Ishitani et al., 2002] (Kapitel 2.6 und 2.7).

Die *Z. mobilis* TGT hat eine Sequenzidentität von 52 % zur *S. flexneri* TGT [Romier et al., 1997]. Die Bindetaschen der *Z. mobilis* TGT und *S. flexneri* TGT unterscheiden sich nur in einer einzigen Aminosäure. Anstelle von Tyr106 besitzt *S. flexneri* TGT ein Phenylalanin. Das macht das Enzym aus *Z. mobilis* zu einer geeigneten Plattform für das strukturbasierte Design von Inhibitoren, die in die Pathogenese der Bakterienruhr eingreifen [Grädler et al., 2001].

Eine Suche in SWISS-PROT [Bairoch & Apweiler, 2000] brachte 42 TGT-Sequenzen mit einer Sequenzidentität von  $> 34$  % zur *Z. mobilis* TGT hervor. Von diesen enthalten lediglich zwei Proteine ein Tyrosin an der homologen Stelle zu Tyr106 in *Z. mobilis* TGT: die *Z. mobilis* TGT selbst und die TGT des thermophilen Bakteriums *Aquifex aeolicus*. Alle anderen besitzen wie *S. flexneri* TGT ein Phenylalanin an dieser Position. Die Seitenkette von Tyr106 geht in der apo-Struktur der *Z. mobilis* TGT Wasserstoffbrücken zu Asp156 und Gln203 ein (Abb. 2.7 auf Seite 18). In dieser Konformation kann das Substrat preQ<sub>1</sub> nicht binden, da die Bindetasche verschlossen ist [Romier et al., 1998]. Folglich müssen für die Ligandbindung zunächst die Wasserstoffbrücken geöffnet werden. In der Ligand bindenden Konformation geht die Hydroxylgruppe des Tyr106 dann keine Wasserstoffbrücke mehr ein.

Zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte bei der *Z. mobilis* TGT ist eine Präinkubationszeit von 20 min notwendig [Grädler et al., 2001]. Bei der *E. coli* TGT, die 98 % sequenzhomolog zur *S. flexneri* TGT ist [Romier et al., 1997] und ebenfalls ein Phenylalanin anstelle von Tyr106 (*Z. mobilis*-Nummerierung) in der Bindetasche besitzt, ist dagegen keine Präinkubation der Inhibitoren erforderlich [Hoops et al., 1995b]. Da sich die Bindetaschen der beiden Enzyme nur durch den Austausch von Tyr106 gegen Phenylalanin unterscheiden, stellte sich die Frage, ob die zusätzlichen Wasserstoffbrücken, die Tyr106 eingeht, für diese Eigenschaft verantwortlich sind. Dies sollte durch die Mutation von

Tyr106 zu Phenylalanin untersucht werden. Des Weiteren sollte durch die Mutation die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT vollständig in die Bindetasche des *Shigella*-Enzyms, dem eigentlichen *Target*, überführt werden.

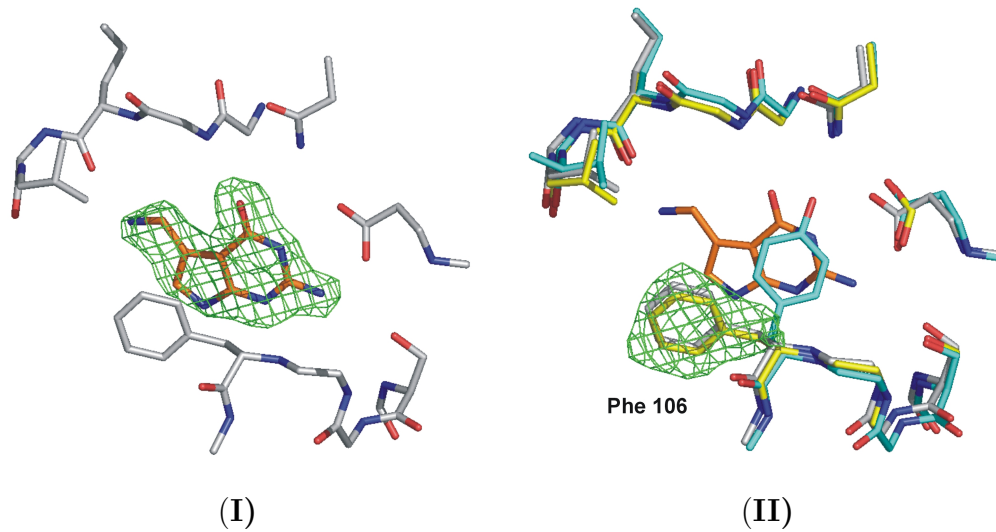
### 3.2.1 Konstruktion und Reinigung von TGT(Y106F)

Die ortsspezifische Mutagenese erfolgte mit Hilfe der PCR-Technik (Kapitel 5.2.4.1) unter Verwendung des *Z. mobilis* TGT Überexpressionsplasmid pETZM4 [Reuter & Ficner, 1995] und den Oligonukleotiden Y106F-s und Y106F-a (Tab. 5.3 auf Seite 147), die das Basenkodon für Phe106 enthielten. Das mutierte Plasmid wurde in kompetente *E. coli* Zellen (XL2-blue, Tab. 5.1 auf Seite 145) transformiert (Kapitel 5.2.4.2) und die Transformanten auf Kanamycin-Agarplatten (Kapitel 5.2.1) selektioniert. Die Transformation erbrachte zahlreiche Klone. Zehn dieser Klone wurden einer Sequenzanalyse unterzogen (Kapitel 5.2.4.4). Diese ergab, dass vier Klone die gewünschte Tyr-106-Phe Mutation enthielten. Das resultierende Plasmid pETZM4-Y106F wurde in kompetente *E. coli* BL21(DE3) pLysS Zellen (Tab. 5.1 auf Seite 145) transformiert (Kapitel 5.2.4.2). Nach Überexpression des mutierten Gens und Reinigung seines Produkt (Kapitel 5.2.5) wurde *Z. mobilis* TGT(Y106F) erhalten.

### 3.2.2 Kristallstruktur der Y106F-TGT

Das mutierte Protein kristallisierte wie der Wildtyp (Kapitel 5.3.1). Die Kristallstruktur von Y106F-TGT im Komplex mit dem natürlichen Substrat preQ<sub>1</sub> wurde mit einer Auflösung von 1,9 Å bestimmt. Die |Fo|-|Fc|-Elektronendichte des Liganden (konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) war sehr gut definiert (Abb. 3.4.I) und zeigte erwartungsgemäß den gleichen Bindungsmodus wie im Wildtyp.

Die ligandfreie Struktur des mutierten Proteins wurde mit einer Auflösung von 1,95 Å bestimmt (Abb. 3.4.II). Sie zeigt eine sehr interessante Konformationsänderung im Vergleich zu der des Wildtyps. Wie oben beschrieben, blockiert die Seitenkette von Tyr106 der apo-Form der w.t.-TGT die Bindetasche, indem sie Wasserstoffbrücken zu Asp156 und Gln203 eingeht (Abb. 2.7.I). In einer vorangegangenen Arbeit wurde für Fluoreszenzuntersuchungen Tyr106 zu Tryptophan mutiert [Grädler, 2000]. In der apo-Struktur dieser mutierten TGT ist das Tryptophan ungeordnet. Die apo-Struktur der *P. horikoshii* TGT, die wie die Y106F-Mutante ebenfalls ein Phenylalanin an dieser Position



**Abb. 3.4** Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT(Y106F) im Komplex mit preQ<sub>1</sub> (I) (1,9 Å Auflösung) und der apo-Form (II) (1,95 Å Auflösung). (I) Die Position des Liganden (orange) konnte eindeutig in der positiven |Fo|-|Fc|-Dichte, konturiert auf 2,5  $\sigma$ , identifiziert werden. (II) Kristallstruktur der apo-Form der *Z. mobilis* TGT(Y106F) (gelb), überlagert mit TGT-Y106F-preQ<sub>1</sub> (grau) und der apo-Struktur des Wildtyp-Enzyms (grünblau). Die Form der positiven |Fo|-|Fc|-Dichte, konturiert auf 2,5  $\sigma$ , nach der ersten Verfeinerung (Populationsparameter für Tyr106 auf 0 gesetzt) zeigt eindeutig, dass Phe106 im Gegensatz zur apo-Struktur der w.t.-TGT die gleiche Konformation wie bei der Substratbindung einnimmt.

in der aktiven Tasche besitzt, weist einen komplett ungeordneten Bereich über 10 Aminosäuren für diese Region auf [Ishitani et al., 2002]. Es stellt sich nun die Frage, welche Konformation die Seitenkette von Phe106 in der Mutante einnimmt.

Als Startgeometrie für die Verfeinerung der Y106F-TGT wurde die apo-Struktur des Wildtyp-Proteins verwendet. Im ersten Verfeinerungszyklus wurden dabei die Populationsparameter für Tyr106 auf 0 gesetzt. In der positiven |Fo|-|Fc|-Dichte (konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) ist Phe106 eindeutig in der offenen, Substrat bindenden Konformation zu sehen (Abb. 3.4.II).

Somit existieren nun Kristallstrukturen der *Z. mobilis* TGT und ihrer mutierten Formen, die drei verschiedene Konformationen der Seitenkette der Aminosäure an Position 106 zeigen:

- die apo-Struktur des w.t. mit durch Tyr106 geschlossener Bindetasche,
- die apo-Struktur der Y106W-TGT mit ungeordneter Konformation der Seitenkette von Trp106 und
- die apo-Struktur der Y106F-TGT mit offener Bindetasche.

Im Folgenden wurde untersucht, ob das Vorhandensein einer offenen Bindetasche in der ligandfreien Form des Enzyms einen Einfluss auf die erforderliche Präinkubationszeit bei der Bestimmung der  $K_i$ -Werte der Inhibitoren hat.

### 3.2.3 Biochemische Charakterisierung der Y106F-TGT

#### Bestimmung der kinetischen Parameter

Die kinetischen Parameter der Y106F-TGT wurden, wie in Kapitel 5.2.8.1 beschrieben, bestimmt. Die Konzentration des variabel gehaltenen Substrats betrug jeweils 0 - 15  $\mu\text{M}$  und die des zweiten Reaktionspartners 20  $\mu\text{M}$ . Die Enzymkonzentration betrug jeweils 150 nM.

Die kinetischen Parameter für tRNA als Substrat sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Im Rahmen der Fehlergrenzen sind die Werte identisch mit denen, die beim Wildtyp-Enzym bestimmt worden sind Grädler [2000]).

**Tab. 3.2 Kinetische Charakterisierung der Y106F-TGT-Mutante mit tRNA als Substrat.**

Im Rahmen der Fehlergrenzen sind die Werte identisch mit denen, die beim Wildtyp-Enzym bestimmt worden sind.

	TGT (w.t)	TGT (Y106F)
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$1,0 \pm 0,4$	$0,38 \pm 0,09$
$V_{max}$ [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]	$61,5 \cdot 10^{-3} \pm 4,3 \cdot 10^{-3}$	$44,7 \cdot 10^{-3} \pm 6,7 \cdot 10^{-3}$
$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$	$0,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,07 \cdot 10^{-2}$
$k_{cat}/K_m$ [ $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$13,9 \cdot 10^{-3} \pm 1,0 \cdot 10^{-3}$	$13,3 \cdot 10^{-3} \pm 1,4 \cdot 10^{-3}$

In Tabelle 3.3 sind die kinetischen Parameter für Guanin als Substrat aufgeführt. Auch diese Werte fallen unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen in denselben Bereich wie die des Wildtyp-Enzyms.

Die Y106F-TGT ist demnach aktiv. Der Austausch von Tyr106 gegen Phenylalanin hat die katalytische Effizienz des Enzyms gegenüber beiden Substraten (tRNA und Guanin) nicht beeinflusst. Die kinetischen Parameter des mutierten Enzyms liegen im selben Bereich wie die des Wildtyps.

**Tab. 3.3 Kinetische Charakterisierung der Y106F-TGT-Mutante mit Guanin als Substrat.** Im Rahmen der Fehlergrenzen sind die Werte identisch mit denen, die beim Wildtyp-Enzym bestimmt worden sind.

	TGT (w.t)	TGT (Y106F)
$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$0,38 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$
$V_{max}$ [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]	$48,8 \cdot 10^{-3} \pm 3,3 \cdot 10^{-3}$	$38,9 \cdot 10^{-3} \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$
$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$1,1 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$	$0,4 \cdot 10^{-2} \pm 0,04 \cdot 10^{-2}$
$k_{cat}/K_m$ [ $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$28,9 \cdot 10^{-3} \pm 8,3 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$

### Untersuchung der erforderlichen Präinkubation von Inhibitoren

Mit Inhibitor **5** (Tab. 2.2 auf Seite 25) sollte der Einfluss der Mutation auf die erforderliche Präinkubation zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte untersucht werden. Dazu wurde dem Reaktionsansatz der Ligand in einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  zugesetzt. Die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion wurde im Zeitintervall von 0 bis 20 Minuten bestimmt (Kapitel 5.2.8.2).

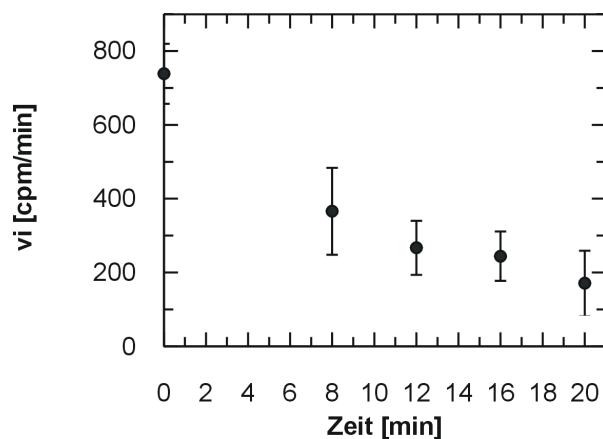
Nach 12 Minuten der Präinkubation nimmt die Anfangsgeschwindigkeit der inhibierten Reaktion um fast 60 % des Anfangswertes ab (Abb. 3.5). Präinkubation um weitere acht Minuten führt zu keiner weiteren Abnahme der Geschwindigkeit. Dasselbe Verhalten wurde auch bei der Präinkubation des Wildtyp-Enzyms mit Inhibitoren gefunden [Grädler, 2000]. Obwohl in der Y106F-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp die Binde-tasche in der apo-Struktur geöffnet ist (Abb. 3.4.II), hat dies demnach keinen Einfluss auf die erforderliche Präinkubation der Inhibitoren.

### Bestimmung der Inhibitionskonstante

Mit Inhibitor **5** (Tab. 2.2 auf Seite 25) wurde wie in Kapitel 5.2.8.2 beschrieben ein  $K_i$ -Wert bestimmt. Wegen des leicht erhöhten  $K_m$ -Wertes der Y106F-TGT im Vergleich zum Wildtyp wurde aber eine höhere Guanin-Konzentration eingesetzt (2 und  $3 \mu\text{M}$ ). Der  $K_i$ -Wert von **5** beträgt  $4,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$ . Damit ist er um ca. Faktor 20 höher als der  $K_i$ -Wert derselben Verbindung mit dem Wildtyp-Enzym ( $K_i = 0,2 \mu\text{M}$ ) [Grädler et al., 2001].

Ein ähnlicher Trend wurde zuvor schon bei einem anderen Inhibitor beobachtet. Der  $K_i$ -Wert von **16** ist bei der *E. coli* TGT um ca. eine Größenordnung höher als bei der *Z. mobilis* TGT (Tab. 3.4) [Hoops et al., 1995b; Grädler et al., 2001]. Allerdings wurde



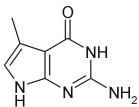
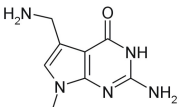


**Abb. 3.5** Untersuchung des Einflusses der Y106F-Mutation auf die erforderliche Präinkubation von Inhibitoren zur Bestimmung von  $K_i$ -Werten. Dem Reaktionsansatz wurde **5** (Tab. 2.2 auf Seite 25) in einer Konzentration von 50 zugesetzt. Die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion [cpm/min] ist gegen die Präinkubationszeit aufgetragen. Es wurden die Messwerte aus zwei Messreihen gemittelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

auch schon der genau gegenläufige Effekt beobachtet. Der  $K_i$ -Wert von **17** ist bei der *E. coli* TGT im Vergleich zur *Z. mobilis* TGT um eine Größenordnung verringert.

Um den Einfluss der Mutation von Tyr106 zu Phenylalanin auf die  $K_i$ -Werte von Inhibitoren beurteilen zu können, ist deshalb eine Studie mit weiteren unterschiedlichen Inhibitoren erforderlich.

**Tab. 3.4** Vergleich von  $K_i$ -Werten, die sowohl mit der *Z. mobilis* TGT als auch mit der *E. coli* TGT bestimmt wurden.

Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu$ M ], <i>Z. mobilis</i>	$K_i$ [ $\mu$ M ], <i>E. coli</i>
<b>16</b>		61	506
<b>17</b>		5,1	0,5

### 3.2.4 Schlussfolgerungen

Ziel dieses Projektes ist es, Inhibitoren der Shigellen TGT zur Behandlung der Bakterienruhr zu entwerfen. Da die Kristallstruktur der Shigellen TGT nicht gelöst ist, wird für das strukturbasierte Design auf die Struktur der *Z. mobilis* TGT zurückgegriffen [Grädler et al., 2001]. Durch die Mutation von Tyr106 zu Phenylalanin wurde die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT in die der Shigellen TGT, dem eigentlichen *Target*, umgewandelt. Die Bindetasche der *S. flexneri* TGT identisch ist zu der von *E. coli* TGT [Romier et al., 1997]. Folglich wurde deren Bindetasche zugleich ebenfalls erhalten.

Die Y106F-Variante der *Z. mobilis* TGT wurde gereinigt und kristallisiert. Die kinetische Charakterisierung des mutierten Proteins zeigte, dass die kinetischen Parameter in denselben Bereich wie die des Wildtyp-Enzyms fallen. Die kinetischen Parameter der *Z. mobilis* TGT und der *E. coli* TGT sind praktisch identisch [Reuter & Ficner, 1995]. Demnach liegen auch die katalytischen Parameter der Mutante und der *E. coli* TGT in einem vergleichbaren Bereich. Das Shigellen-Protein ist bisher noch nicht kloniert wurden. Folglich liegen sind dafür keine kinetischen Parameter bekannt.

Die Kristallstrukturanalyse von TGT(Y106F)·preQ<sub>1</sub> hat gezeigt, dass das Substrat den gleichen Bindungsmodus wie im Wildtyp einnimmt. Im Vergleich zur apo-Struktur des Wildtyp-Enzyms nimmt die Seitenkette von Phe106 in der apo-Struktur des mutierten Proteins eine andere Konformation wie die von Tyr106 ein. Tyr106 verschließt durch ein Wasserstoffbrücken zu Asp156 und Gln203 die Bindetasche. In der Y106F-Variante der TGT nimmt die Seitenkette von Phenylalanin die gleiche Konformation wie bei der Substratbindung ein, die Bindetasche ist also in der apo-Struktur geöffnet. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die erforderliche Präinkubation der Inhibitoren bei der Bestimmung von  $K_i$ -Werten. Bei der *E. coli* TGT ist keine Präinkubation notwendig [Hoops et al., 1995b], hingegen aber bei der *Z. mobilis* TGT [Grädler et al., 2001]. Obwohl in der Y106F-TGT nun die Bindetasche der *E. coli* TGT vorliegt, ist weiterhin eine stark zeitabhängige Zunahme der Inhibition nach Präinkubation zu beobachten. Die Anlagerung der Liganden in der Bindetasche scheint demnach durch komplexere Vorgänge gesteuert zu sein.

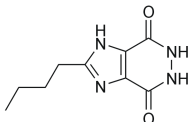
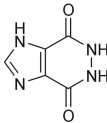
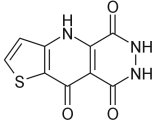
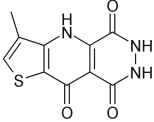
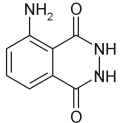
Der  $K_i$ -Wert der gemessenen Verbindung bei der mutierten TGT liegt etwa um Faktor 20 höher als der mit dem Wildtyp-Enzym gemessene. Von zwei weiteren Inhibitoren wurde bisher sowohl ein  $K_i$ -Wert mit *Z. mobilis* TGT als auch mit *E. coli* TGT gemessen [Hoops et al., 1995b; Grädler et al., 2001]. Beim Vergleich der  $K_i$ -Werte ist kein eindeutiger Trend festzustellen. Während der eine  $K_i$ -Wert um eine Größenordnung zu-

genommen hat, wurde der andere um eine Größenordnung vermindert. Um den Einfluss der Mutation von Tyr106 zu Phenylalanin auf die  $K_i$ -Werte von Inhibitoren beurteilen zu können, ist eine Studie mit weiteren unterschiedlichen Inhibitoren erforderlich.

### 3.3 Virtuelles Screening basierend auf einem neuem Bindungsmodus

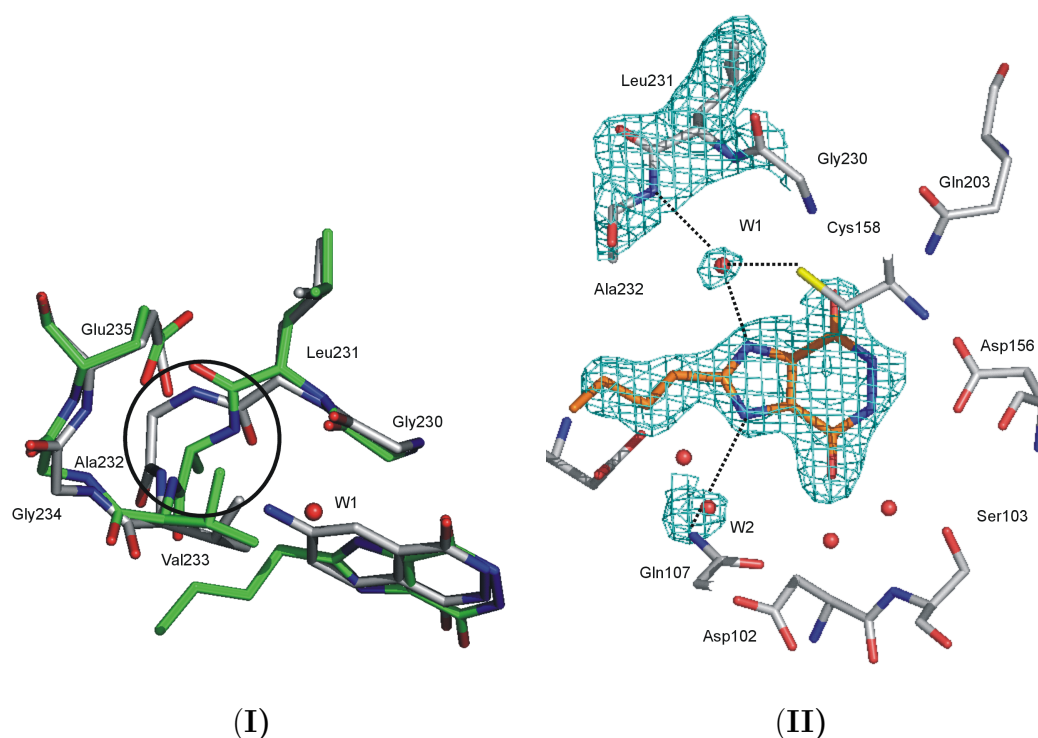
In einer vorangegangenen Arbeit wurden Pyridazindione als mikromolare und submikromolare Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT entdeckt (Kapitel 2.9.1, [Grädler et al., 2001]). Dabei ist aufgefallen, dass eine Wasserstoffbrücke zu Leu231 offensichtlich essentiell für eine gute Affinität der Inhibitoren ist. Um die molekularen Erkennungseigenschaften der Pyridazindione näher zu untersuchen, wurde die „NovoNordisk Compound Database“ (NNCD) nach korrespondierenden Analogen durchsucht [Nærum et al., 2001]. Von den dabei gefunden Verbindungen wurden die in Tabelle 3.5 aufgeführten zur Testung auf Inhibition ausgewählt.

**Tab. 3.5** Liste der Pyridazindione, die in der NNCD gefunden und auf TGT-Inhibition getestet wurden.

Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
18		$83 \pm 18$
19		$200 \pm 70$
20		$5,0 \pm 1,2$
21		$4,7 \pm 1,0$
22		$36 \pm 11$

Beim Versuch, diese Verbindungen in die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT mit FLEXX [Rarey et al., 1996] einzupassen, wurden außer für Verbindung **22** keine plausiblen Bindungsmoden gefunden. Keiner der Inhibitoren schien die wichtige Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Leu231 ausbilden zu können. Um so überraschender war es,

dass die  $K_i$ -Werte aller Verbindungen in den mikromolaren Bereich fielen, die von Verbindung **20** und **21** sogar in den unteren mikromolaren Bereich (Tab. 3.5).



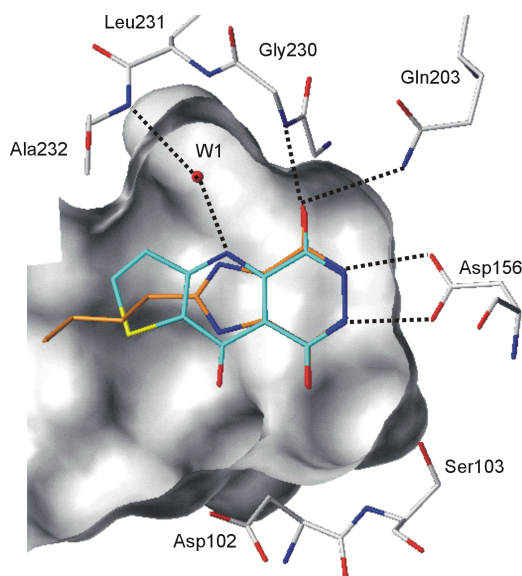
**Abb. 3.6 (I) Überlagerung der Proteinstruktur der TGT im Komplex mit 4 (grau) und 18 (grün).** Die Peptidbindung zwischen Ala232 und Leu231 in TGT·18 im Vergleich zu TGT·4 ist umgeklappt (Kreis). Dadurch wird die Carbonylgruppe von Leu231 aus der Bindetasche heraus- und die NH-Gruppe von Ala232 in die Bindetasche hineingedreht. Die Seitenkette von Leu231 ändert ihre Position nicht. **(II) Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit 18 bei einer Auflösung von 2,1 Å.** Die umgeklappte Peptidbindung, die Wassermoleküle W1 und W2 sowie der Ligand 18 sind sehr gut in der |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (simulated annealing Omit-Map, konturiert auf 3,0  $\sigma$ ) des verfeinerten Modells zu erkennen.

Um diese überraschend gute Affinität erklären zu können, wurde versucht, die Inhibitoren in Kristalle der TGT einzudiffundieren. Mit dem gut löslichen Liganden **18** konnte eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,1 Å bestimmt werden. Unerwarteterweise zeigt diese Struktur, dass die Peptidbindung zwischen Ala232 und Leu231 umgeklappt ist (Abb. 3.6.I). Dadurch wird die Carbonylgruppe von Leu231 aus der Bindetasche heraus- und die NH-Gruppe von Ala232 in die Bindetasche hineingedreht. Die Seitenkette von Leu231 hingegen ändert ihre Position nicht. Außerdem vermittelt nun ein Wassermolekül (W1) den Kontakt zwischen dem Liganden und der amidischen NH-Gruppe von Ala232 (Abb. 3.6.II). Dieses Wassermolekül geht zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zum Schwefelatom von Cys158 ein. An dieser Stelle wurde bisher kein

Wassermolekül in einer Struktur der *Z. mobilis* TGT gefunden. Das Wassermolekül hat einen B-Faktor von nur  $34,8 \text{ \AA}^2$ . Dieser liegt in derselben Größenordnung wie die B-Faktoren der Ligandatome. Das ist ein Hinweis darauf, dass das Wassermolekül fest gebunden ist.

Des Weiteren ist die Seitenkette von Gln107 zum Liganden rotiert. Sie geht eine Wasserstoffbrücke zu einem zweitem Wassermolekül (W2) ein, welches einen zusätzlichen Kontakt zum Liganden vermittelt.

Das unerwartete Auftreten von zwei vom Liganden induzierten strukturellen Veränderungen der Bindetasche wäre mit dem gegenwärtigem Wissen über die Ligand-TGT-Bindung nicht vorhersagbar gewesen. Es zeigt klar die inhärenten Begrenzungen in der Vorhersage von Bindungsmoden, auch wenn bereits mehrere Ligand-Protein-Komplexe mit ähnlichen Liganden charakterisiert wurden. Weiter unterstreicht es die Wichtigkeit der Kristallstrukturanalyse als Voraussetzung zum erfolgreichen iterativen strukturbasierten Design von Inhibitoren.



**Abb. 3.7** Kristallographisch bestimmter Bindungsmodus von **18** (orange) im Vergleich zum modellierten Bindungsmodus von **20** (grünblau). Die Liganden wurden so überlagert werden, dass beide Pyridazindion-Einheiten dieselben Wechselwirkungen zur TGT eingehen. Das Stickstoffatom des Pyridinonrings von **20** befindet sich an der gleichen Position wie ein Stickstoffatom des Imidazolrings von **18**. Bei der Bindung von **20** liegt vermutlich die gleiche Proteinrückgrat-Konformation an Leu231 und Ala232 vor, wie sie auch in der Kristallstruktur von TGT·**18** gefunden wurde. Analog dazu wird wahrscheinlich der Kontakt von dieser Region zum Liganden durch das Wassermolekül W1 vermittelt.

Basierend auf der Kristallstruktur von TGT·**18** können plausible Bindungsmoden für **19**, **20** und **21** modelliert werden. Exemplarisch ist der Bindungsmodus von **20** in Abb. 3.7 dargestellt. Der Ligand wurde in der Bindetasche der TGT mit **18** so überlagert, dass beide Pyridazindion-Einheiten dieselben Wechselwirkungen zum Protein eingehen und das Stickstoffatom des Pyridinonrings von **20** sich an der gleichen Position befindet wie ein Stickstoffatom des Imidazolrings von **18**. Dieses kann dann ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zum Wassermolekül W1 eingehen. Folglich liegt vermutlich die gleiche Rückgrat-Konformation an Leu231 und Ala232 vor, wie sie auch in der Kristallstruktur von TGT·**18** gefunden wurde.

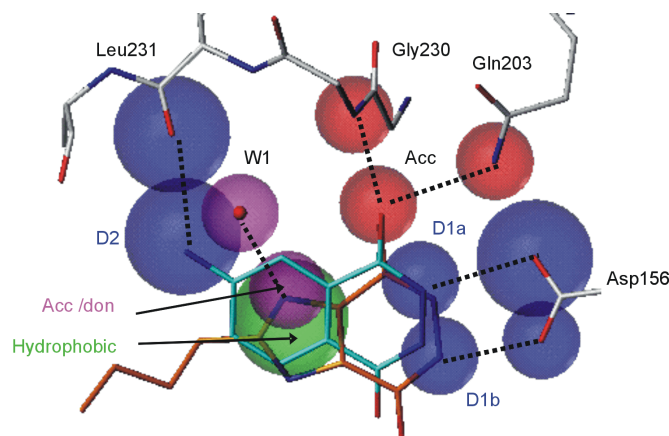
Die Konformation der Peptidbindung von Leu231 zu Ala232 in TGT·**18** ist dieselbe, wie in den Kristallstrukturen der *P. horikoshii* TGT für die entsprechenden Aminosäuren Val197 und Val198 (Kapitel 2.7, [Ishitani et al., 2002]). Darauf wird in Kapitel 3.5.3 näher eingegangen.

### 3.3.1 Generierung eines zusammengesetzten Pharmakophor-Modells

Die Entdeckung dieses neuen Bindungsmodus, der aus einer Beweglichkeit des Protein-Rückgrats in dieser Region resultiert, führte dazu, eine strukturbasierte Pharmakophor-Hypothese für das virtuelle Screening abzuleiten. Dafür wurden die beiden unterschiedlichen Bindungsmoden von TGT-Inhibitoren, die durch Kristallstrukturanalyse bekannt waren, einbezogen (Abb. 3.8).

Aus einer früheren Arbeit ist bekannt, dass die Wasserstoffbrücke des Liganden zur Carbonylgruppe von Leu231 stark zur Affinität beiträgt [Grädler et al., 2001]. In der neu entdeckten Protein-Konformation vermittelt ein Wassermolekül (W1) die Wechselwirkung zwischen Ligand und diesem Bereich der Bindetasche. Dieses Wassermolekül ist offensichtlich fest gebunden (s.o.). Deshalb wurde es in der Suchanfrage alternativ zur Wechselwirkung zur Carbonylgruppe von Leu231 berücksichtigt. Wassermoleküle haben sowohl Wasserstoffbrücken-Akzeptor- als auch -Donor-Eigenschaften. Um diese Eigenschaft zu komplementieren, können deshalb potenzielle Liganden entweder eine Wasserstoffbrücken-Donor- oder Akzeptor-Eigenschaft an dieser Position aufweisen. Diese ambivalente Eigenschaft wurde in der Suchanfrage durch die alternative Verknüpfung eines Wasserstoffbrücken-Donors mit einem -Akzeptor realisiert.

Die meisten der zur Zeit entdeckten fest bindenden Liganden sowie das Substrat preQ<sub>1</sub>



**Abb. 3.8 Strukturbasierte Pharmakophor-Hypothese.** Die Liganden sowie das Protein sind zur Verdeutlichung gezeigt. Die Wechselwirkung zur Carbonylgruppe von Leu231 wurde alternativ zur Wechselwirkung zum Wassermolekül W1 berücksichtigt. Donorgruppen sowie die dazugehörigen Akzeptorgruppen auf Proteinseite sind blau eingefärbt, Akzeptorgruppen sowie die dazugehörigen Donorgruppen auf Proteinseite rot und die ambivalente Donor-Akzeptor-Gruppe sowie die dazugehörige Akzeptor-Donor-Eigenschaft des Wassermoleküls violett. Die hydrophobe Eigenschaft ist grün markiert.

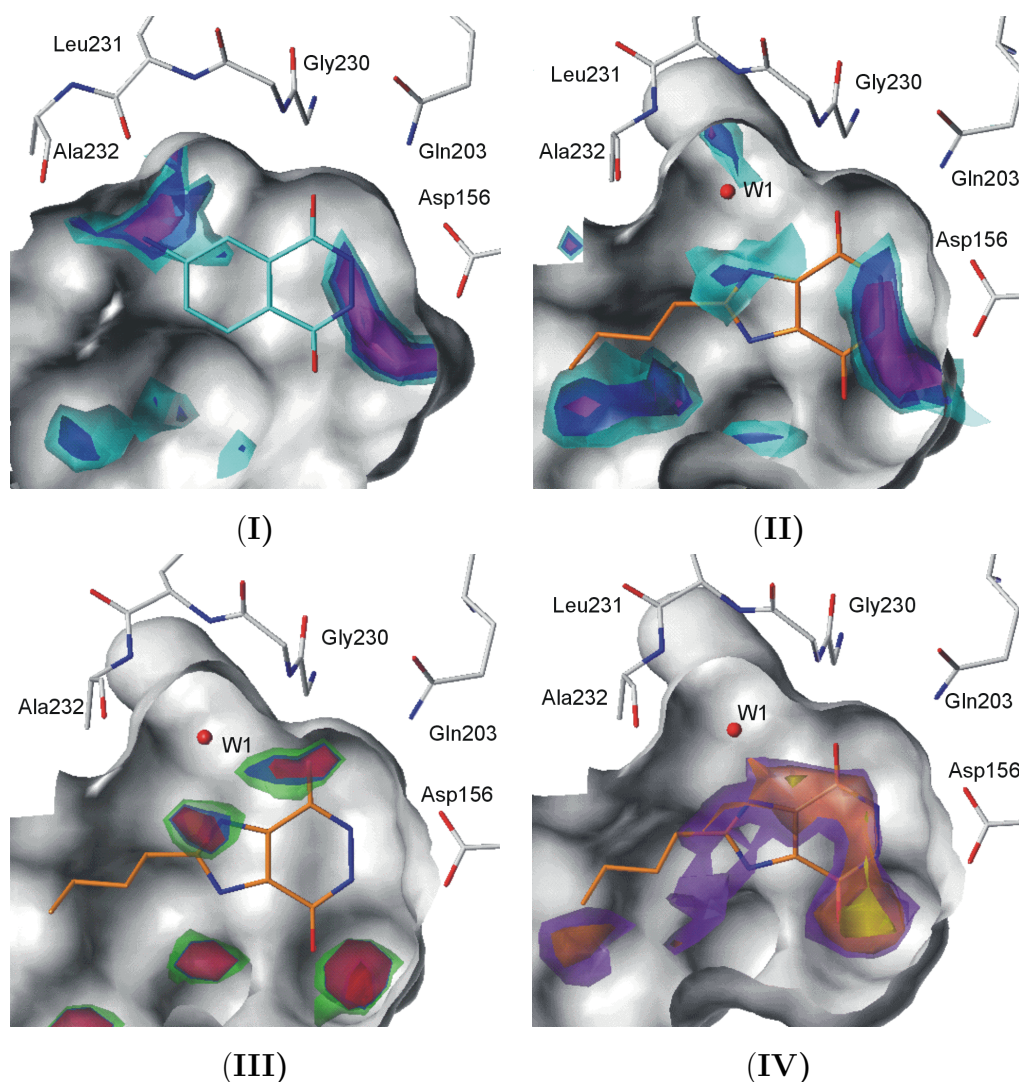
exponieren eine Akzeptor-Eigenschaft in Richtung Gly230 und Gln203 sowie zwei Donor-Eigenschaften zu Asp156 [Grädler et al., 2001; Meyer et al., 2002]. Deshalb wurden diese Eigenschaften ebenfalls in die Pharmakophor-Hypothese einbezogen.

Um diese qualitativen Überlegungen auf eine quantitative Basis zu stellen, wurde eine „Hot Spot“-Analyse der Bindetasche durchgeführt (Kapitel 5.4.1). Dazu wurden verschiedene Sonden in SUPERSTAR [Verdonk et al., 1999] und DRUGSCORE [Gohlke et al., 2000b] verwendet. Diese Strategie wurde bereits erfolgreich zur Auffindung von Inhibitoren der humanen Carboanhydrase II von Grüneberg et. al. angewandt [Grüneberg et al., 2001, 2002].

SUPERSTAR ist eine Methode, um ausgezeichnete Wechselwirkungsbereiche in Protein-Bindetaschen zu identifizieren. Sie basiert auf der experimentellen Information über nicht bindende Wechselwirkungen. Diese wurde aus der Analyse von Packungsmustern in Kristallstrukturen kleiner Moleküle abgeleitet. DRUGSCORE hingegen basiert auf Informationen über Ligand-Protein-Komplexe. Die Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Protein-Ligand-Kontakte wurde in Atom/Atom-Paar-Potenziale übersetzt. SUPERSTAR berücksichtigt explizit die Orientierung von Wasserstoffatomen. Deshalb wurden für diese Rechnungen die Wasserstoffatome des Wassermoleküls W1 entweder als Wasserstoffbrücken-Donor oder -Akzeptor in Bezug auf den Liganden ausgerichtet.



DRUGSCORE benötigt keine Festlegung des Protonierungszustands von Liganden und Proteinen. Deshalb wurde hier für das Wassermolekül ein  $\text{sp}^3$ -Sauerstoff gesetzt.



**Abb. 3.9 „Hot Spots“ in der Bindetasche der *Z. mobilis* TGT.** Zur Orientierung ist die kristallographisch bestimmte Bindungsgeometrie der Inhibitoren **4** (grünblau) bzw. **18** (orange) gezeigt. (I, II) „Hot Spots“ berechnet für eine Wasserstoffbrücken-Donor-Sonde (N.3) mit DRUGSCORE, konturiert auf 80 (grünblau), 84 (blau) und 88 % (violett); (I) Bindetasche der TGT wie sie im Komplex mit **4** vorliegt; (II) Bindetasche der TGT wie sie im Komplex mit **18** vorliegt; (III) „Hot Spots“ für eine Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Sonde (Carbonyl-Sauerstoff) berechnet mit SUPERSTAR, konturiert auf die Wahrscheinlichkeitsniveaus 4 (grün), 8 (blau) und 10 (rot); (III) „Hot Spots“ berechnet für eine hydrophobe Sonde (C.ar) mit DRUGSCORE, konturiert auf 89 (violett), 91 (orange) und 95 % (gelb).

Die Ergebnisse der „Hot Spot“-Analyse sind in Abb. 3.9 dargestellt. Abb. 3.9.I zeigt die „Hot Spots“, die mit einer Wasserstoffbrücken-Donor-Sonde (N.3) mit DRUGSCORE für die Bindetaschen-Konformation, wie sie im Komplex mit **4** vorliegt (Abb. 3.10.I),

berechnet worden sind. In Abb. 3.9.II ist das gleiche dargestellt, nun aber für die Bindetasche wie sie im Komplex mit **18** vorliegt (Abb. 3.10.II). Der direkte Vergleich der Felder zeigt deutlich die Verschiebung des Donor-„Hot Spots“ nach dem Einbau des interstitiellen Wassermoleküls von dem Bereich, in dem die Aminogruppe von **4** liegt, zu dem Bereich, in dem sich der Imidazolstickstoff von **18** befindet.

Abb. 3.9.III zeigt die „Hot Spots“, die für eine Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Sonde in der Bindetasche mit der umgeklappten Protein-Rückgrat-Konformation berechnet worden sind (Abb. 3.10.III). Diese Felder wurden mit SUPERSTAR berechnet, wobei das Wassermolekül W1 in Bezug auf den Liganden als Wasserstoffbrücken-Donor behandelt wurde. Der Imidazolstickstoff sowie eine Carbonylgruppe von **18** befinden sich in als günstig für Wasserstoffbrücken-Akzeptoren berechneten Bereichen. Die zweite Carbonylgruppe befindet sich nicht in einem ausgezeichneten Bereich. Sie geht nur mit Wassermolekülen Wechselwirkungen ein, die in der Berechnung nicht berücksichtigt worden sind.

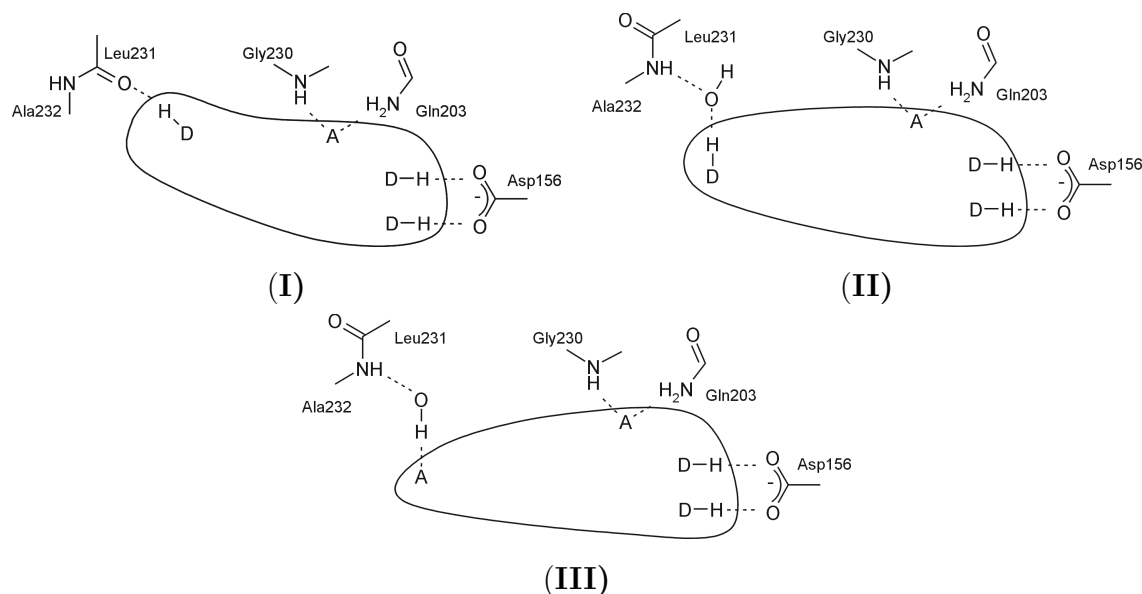
Die Felder in Abb. 3.9.II und Abb. 3.9.III zusammenbetrachtet, verweisen deutlich auf die ambivalente Donor-Akzeptor-Eigenschaft des interstitiellen Wassermoleküls. Folglich ist an der entsprechenden Position im Liganden sowohl eine Donor- oder als eine Akzeptor-Eigenschaft günstig.

Die mit einer aromatischen Sonde (C.ar) mit DRUGSCORE berechneten „Hot Spots“ sind in Abb. 3.9.IV gezeigt. Sie entsprechen gut der Platzierung des aromatischen Rings, wie er in der Kristallstruktur von **18** gefunden wurde.

Die eben beschriebenen „Hot Spots“ für die Wasserstoffbrücken-Donor-, -Akzeptor- und hydrophob-aromatische Sonde wurden entsprechend dem Protokoll von Grüneberg et al. [Grüneberg et al., 2002] in eine Suchanfrage für UNITY [UNITY, 2001] übertragen. Die Zentren der unterschiedlichen Suchtoleranzsphären wurden definiert, indem die korrespondierenden Atome von **4** bzw. **18** ausgewählt wurden. Die Durchmesser wurden entsprechend der Größe der zu Grunde liegenden „Hot Spots“ angepasst (Abb. 3.8).

### 3.3.2 Virtuelles Screening

In einer vorangegangenen Studie wurde mit dem *De novo* Design-Program LUDI [Böhm, 1992a] ein virtuelles Screening nach TGT-Inhibitoren durchgeführt [Grädler et al., 2001]. In diesem Screening wurde die Suche auf eine Untermenge der ACD beschränkt. In der hier vorliegenden Studie wurde die Suche auf acht unterschiedli-



**Abb. 3.10** Schematische Ansicht der unterschiedlichen Rückgrat-Konformationen in der Bindetasche der TGT. Das daraus resultierenden Wasserstoffbrücken-Muster wurde in der Pharmakophor-Hypothese berücksichtigt. „A“ steht für Akzeptorgruppe und „D“ für Donorgruppe. (I) Rückgrat-Konformation für die Bindetasche, wenn **4** bindet. (II, III) Rückgrat-Konformation für die Bindetasche, wenn **18** bindet. (II) Das Wassermolekül agiert als Akzeptor in Bezug auf den Liganden. (III) Das Wassermolekül exponiert seine Donor-Eigenschaft zum Liganden.

che Datenbanken, die zusammen mehr als 800.000 Verbindungen enthalten, erweitert (Tab. 3.6). Das Screening wurde schrittweise mit den Programmen SELECTOR [Selector, 1996], UNITY und FLEXX [Rarey et al., 1996] durchgeführt. Es bestand aus mehreren hierarchischen Filterschritten mit zunehmender Komplexität und demnach auch zunehmenden Rechenaufwand [Grüneberg et al., 2002]. Im ersten Schritt wurden Verbindungen mit nicht mehr als sieben drehbaren Bindungen und einem Molekulargewicht von weniger als 450 D herausgefiltert. Diese Kriterien wurden gewählt, um (i) sehr flexible Verbindungen zu vermeiden und (ii) um Verbindungen zu bekommen, die klein genug sind, für eine spätere Optimierung. So sollten mehr leitstrukturartige Hits erhalten werden [Oprea et al., 2001; Hann et al., 2001]. Fast 50 % der Verbindungen konnten nicht diesen eher weichen und *Target* unabhängigen Filter passieren. Im zweiten Schritt wurden Verbindungen gesucht, die die Mindestanzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren (2), Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (1) und hydrophoben Eigenschaften (1) enthalten, die erforderlich sind, um die Pharmakophor-Hypothese erfüllen zu können. Etwa 20 % der Ausgangsverbindungen entsprachen diesem Kriterium. Im dritten Schritt wurde die strukturbasierte Pharmakophor-Hypothese (Abb. 3.8) verwendet. Dadurch wurde die räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen sowie die Direktionalität

Tab. 3.6 Übersicht zur Anwendung der hierarchischen Filterschritte auf acht kommerzielle Molekül-Datenbanken

Filterschritt	ACD		AMBINTER		AMBINTER Nat		AEGC	
	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]
1. Drehbare Bindungen / MW 2. Erforderliche Mindestanzahl an hydrophoben, Donor- und Akzeptor-Eigenschaften 3. Pharmakophor-Hypothese 3.1 Zeitlimit-Überschreitung 4. Sterische Information der Bindetasche 4.1 Zeitlimit-Überschreitung	215.212	100,00	114.855	100,00	960	100,00	182.485	100,00
	135.502	62,96	59.580	52,87	297	30,94	91.677	50,24
	41.626	19,34	26.164	22,78	120	12,50	39.068	21,41
	1.223	0,57	496	0,43	0	0,00	591	0,32
	202	0,09	316	0,28	1	0,10	392	0,21
	478	0,22	118	0,10	0	0,00	75	0,04
	128	0,06	55	0,05	0	0,00	115	0,06

Fortsetzung Tabelle 3.6

Filter-schritt	AEPC		ChemStar		IBS		LeadQuest		$\sum$	
	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]
1. 2. 3. 3.1. 4. 4.1.	44.549	100,00	57.927	100,00	158.942	100,00	52.002	100,00	826.952	100,00
	9.417	21,14	28.712	49,57	76.321	48,02	18.231	35,04	419.747	50,76
	5.890	11,65	12.466	21,52	35.661	22,44	8.093	15,56	168.387	20,36
	67	0,15	169	0,29	699	0,44	64	0,12	3.309	0,40
	18	0,04	0	0,00	328	0,21	19	0,04	1.276	0,15
	31	0,07	39	0,07	128	0,08	3	0,01	872	0,11
	6	0,01	45	0,08	152	0,10	7	0,01	508	0,06

der Wasserstoffbrücken beschränkt. Im vierten Schritt wurde zusätzlich zum vorangegangenen die angenäherte Form der Bindetasche als räumlich verbotener Bereich („excluded volumes“) einbezogen. Die so erhaltene Hitliste enthielt 872 Verbindungen. Dementsprechend reduzierten die hierarchischen Filterschritte die Ausgangsmenge auf 0.11 % (Tab. 3.6). In der Hitliste waren nur 16 Duplikate enthalten. Die sieben benutzten Datenbanken enthielten demnach in Bezug auf diese Suchanfrage nur wenig überlappende Information.

Von den letztendlich erhalten 856 Verbindungen konnten 130 die Filter passieren, weil sie eine direkte Wasserstoffbrücke zum Leu231 eingehen. 726 Verbindungen wurden gefunden, weil sie eine Wasserstoffbrücken-Donor- oder -Akzeptor-Eigenschaft zum interstitiellen Wassermolekül W1 exponieren. Dies unterstreicht die Wichtigkeit, das Wassermolekül in der Suche explizit zu berücksichtigen.

Durch dieses Screening wurden Verbindungen aus verschiedenen chemischen Klassen gefunden, so z. B.

- 120 Carbonsäurehydrazide, die direkt mit einem aromatischen Ring verbunden sind,
- 75 Guanin-Derivate,
- 43 Pyrazolamine bzw. Pyrazolole,
- 61 Hydroxyaminopiperidine,
- 33 Carbonsäurehydrazide, die mit einem aliphatischen Kohlenstoff verbunden sind, und
- 20 Pterin-Derivate.

Einige ausgewählte Verbindungen sind in Abb. 3.11 gezeigt.

Die Hitliste wurde visuell inspiziert. Viel versprechend aussehende Verbindungen wurden anschließend in eine der beiden Bindetaschenkonformationen (Abb. 3.10) mit FLEXX eingepasst. Liganden, die nach dem Docking noch der Pharmakophor-Hypothese entsprachen, wurden mit dem MAB-Kraftfeld [Gerber & Müller, 1995] in der Bindetasche minimiert, wobei die Tasche als rigide betrachtet wurde. Die endgültigen Kriterien zur Auswahl von Verbindungen zur biochemischen Testung waren:

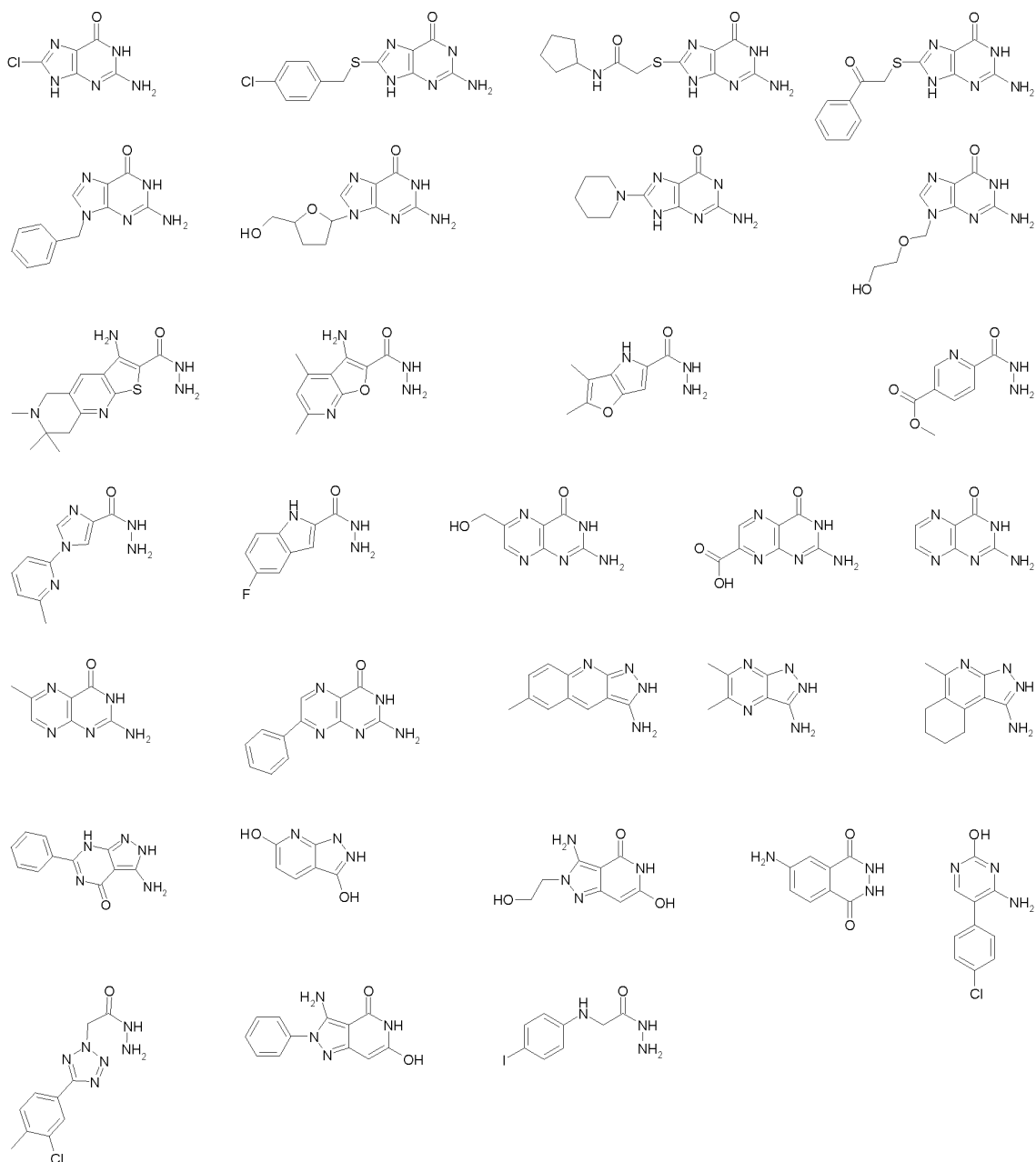


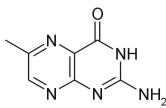
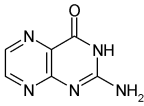
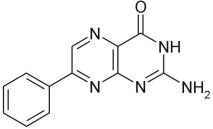
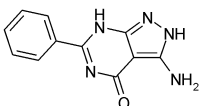
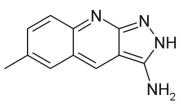
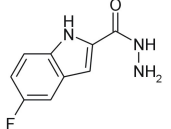
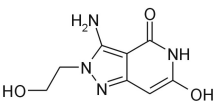
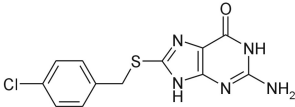
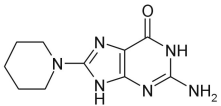
Abb. 3.11 Einige ausgewählte Hits des virtuellen Screenings.

- das Erfüllen des geforderten Wasserstoffbrücken-Netzwerkes,
- die Komplementarität zwischen Ligand- und Proteinoberfläche und
- die Abwesenheit von ungünstigen van der Waals-Wechselwirkungen nach der Minimierung.

## 3.3.3 Testung auf Inhibition

Die Verbindungen **23** - **31** (Tab. 3.7) wurden auf Inhibition der TGT getestet. Alle waren im mikromolaren Bereich aktiv, zwei sogar im submikromolaren Bereich.

**Tab. 3.7** Liste der neun Verbindungen die mit diesem virtuellen Screening entdeckt und anschließend auf Inhibition der TGT getestet wurden.

Nr.	Verbindung	Datenbank	Label	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>23</b>		ACD	MFCD00012137	$0,25 \pm 0,05$
<b>24</b>		ACD / IBS	MFCD00010557 / STOCK1N-11489	$0,6 \pm 0,2$
<b>25</b>		ACD	MFCD02091220	$3,8 \pm 0,1$
<b>26</b>		ACD	MFCD00110262	$249 \pm 47$
<b>27</b>		AEPC	ASN2538273	$156 \pm 36$
<b>28</b>		ACD	MFCD01566929	$72 \pm 5$
<b>29</b>		AEGC	BAS0316634	$8,1 \pm 1,0$
<b>30</b>		AEPC	ASN3578296	$2,7 \pm 0,3$
<b>31</b>		AEGC	BAS0449619	$37 \pm 7$

Für die Pterin-Derivate (**23** - **25**) kann ein ähnlicher Bindungsmodus wie für **18** angenommen werden (siehe auch Kapitel 3.4.3). 6-Methylpterin (**23**) ist mit einem  $K_i$ -Wert von  $0,2 \mu\text{M}$  die aktivste Verbindung, die durch dieses virtuelle Screening entdeckt wurde. Die Aktivität von Pterin (**24**) fällt in denselben Bereich ( $K_i = 0,6 \mu\text{M}$ ). Diese Verbindung wurde bereits mit der eukaryontischen TGT getestet. Dort hat sie einen  $K_i$ -Wert von  $90 \text{ nM}$  [Jacobson et al., 1981]. Das dritte Pterin-Derivat (**25**, 7-Phenylpterin) besitzt einen  $K_i$ -Wert von  $3,8 \mu\text{M}$ . Ein Grund für die reduzierte Affinität im Vergleich zu **23** und **24** kann darin liegen, dass **25** eine ungünstige Konformation in der Bindetasche annehmen muss. Der optimale Torsionswinkel zwischen dem Phenylring und der Pterin-Einheit beträgt etwa  $40^\circ$ . Wenn diese Konformation in der Bindetasche angenommen würde, würde die planare Stapelung zwischen der Pterin-Einheit und Tyr106 wegen des 7-Phenylrings gestört werden. Dementsprechend wird der Ligand wahrscheinlich gezwungen, eine ungünstige, nicht planare Konformation in der Bindetasche anzunehmen.

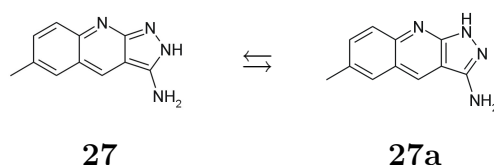


Abb. 3.12 Tautomere Formen der Pyrazolamine.

Pyrazolamine (**26** - **27**) gehören zu einer neuen Verbindungsklasse von TGT-Inhibitoren. Verglichen mit dem natürlichen Substrat preQ<sub>1</sub>, das einen  $K_m$ -Wert von  $0,2 \mu\text{M}$  zum *E. coli*-Enzym besitzt [Hoops et al., 1995a], sind sie nur sehr schwache Inhibitoren. Ein Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass im Vergleich zu preQ<sub>1</sub> die Akzeptorgruppe nicht eine exocyclische Carbonylgruppe, sondern eine aromatische Amino-Funktion ist. Abhängig von der tautomeren Form dieser Moleküle kann der N1-Stickstoff entweder als Wasserstoffbrücken-Akzeptor fungieren (**27**) oder aber ein Wasserstoffatom tragen (**27a**) und hat somit folglich Donor-Eigenschaften (Abb. 3.12). Das letztere Tautomer entspricht nicht dem Pharmakophor-Modell und ist ungünstig für die Bindung. Quantenmechanische Berechnungen auf dem HF/6-31G(d)-Niveau mit Gaussian 98 [Frisch et al., 1998] haben aber ergeben, dass diese Konformation die signifikant stabilere ist (Christoph Sotriffer, persönliche Mitteilung). Entsprechend existiert **27** in Lösung vorwiegend in der inaktiven Form. Des Weiteren erfüllt **27** auch in der aktiven Form nicht perfekt die idealen Anforderungen für gute Wechselwirkungen. Die Distanz zwischen der Akzeptorgruppe, die zu Gly230-NH und Gln203-NH<sub>2</sub> exponiert ist, und den zwei Donorgruppen, die zu Asp156 exponiert sind, ist, verglichen mit den entsprechenden



Gruppen in preQ<sub>1</sub>, viel kürzer. Als Folge resultieren wahrscheinlich nur schwache Wasserstoffbrücken zu Glu203 und Gly230. Diese beiden Aspekte liefern eine Erklärung für die verminderte Bindungsaffinität.

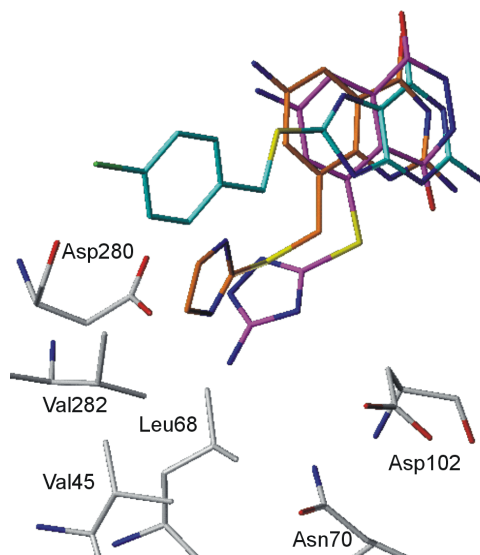
Offenkettige Carbonsäurehydrazide sind die zweite neu entdeckte Verbindungsklasse für TGT-Inhibitoren. Der  $K_i$ -Wert von **28** fällt in denselben Bereich wie die  $K_i$ -Werte der Pyridazindione **18** und **22**. Verglichen mit Pyridazindionen sind Carbonsäurehydrazide aber durch Substitution freier Carbonsäuren bzw. ihrer Ester chemisch einfacher zugänglich [Hiremath et al., 1983]. Zahlreiche Ester und Säuren sind kommerziell erhältlich. Des Weiteren sind unter bekannten Arzneistoffen auch offenkettige Carbonsäurehydrazide. So wird z. B. Isoniazid häufig zur Behandlung der Tuberkulose eingesetzt. Es wird selbst Kindern über einen Zeitraum von bis zu einem halben Jahr verabreicht, ohne dass dabei schwere unerwünschte Wirkungen beobachtet werden [Al-Dossary et al., 2002]. Folglich kann **28** als geeignete Leitstruktur für eine weitere Optimierung dienen.

Verbindung **29** ist der erste Inhibitor, der wahrscheinlich über eine Hydroxylgruppe eine Wechselwirkung mit Asp156 eingeht. Die zweite Hydroxylgruppe in der Seitenkette ist bereits ein geeigneter „Linker“, um weitere Reste einzuführen. Diese könnten dann mit weiteren Aminosäuren in stärker dem Lösungsmittel zugewandte Bereiche der Substratbindestelle wechselwirken.

Bei den Verbindungen **30** und **31** handelt es sich um Guanin-Derivate. Guanin selbst, welches ein Substrat der TGT ist (Tab. 2.1), besitzt einen  $K_m$ -Wert von 0,7  $\mu$ M [Reuter & Ficner, 1995]. Der  $K_i$ -Wert von **31** ist etwa 1,5 Größenordnungen höher. Dies ist wahrscheinlich auf eine sterische Hinderung durch den Piperidinring zurückzuführen. Der  $K_i$ -Wert von **30** hingegen ist mit 2,7  $\mu$ M nur wenig höher als der  $K_m$ -Wert von Guanin.

Bisherige Strategien, die Affinität von TGT-Inhibitoren zu erhöhen, zielten darauf ab, Fragmente einzuführen, die entweder mit den polaren funktionellen Gruppen von Asp102, Asp280 und Asn70 wechselwirken [Grädler et al., 2001] oder die hydrophobe Tasche ausfüllen, die von den Aminosäuren Val45, Leu68 und Val282 gebildet wird [Meyer et al., 2002] (Abb. 3.13). Für diese Studien wurden als Grundkörper Benzpyridazindion bzw. 2-Amino-3*H*-chinazolin-4-on verwendet. Die Seitenketten wurden in der 6- bzw. 8-Position eingeführt. Dies führte in beiden Fällen zu Verbindungen, bei denen sich die Seitenketten in der in Abb. 3.13 dargestellten Ansicht unterhalb des Grundkörpers befanden. Die Seitenkette von **30** hingegen ist dazu topologisch unterschiedlich orientiert. Sie geht Wechselwirkungen in einem bisher nicht adressierten Be-

reich der Bindetasche ein. Für diese Verbindung wurde eine viel versprechende Affinität im unteren mikromolaren Bereich gemessen. Dies spricht dafür, dass die zusätzlichen Wechselwirkungen sich günstig auf die Ligandbindung auswirken.



**Abb. 3.13** Überlagerung der Proteinstrukturen der TGT im Komplex mit **10** (violett) und **54** (orange) sowie der Dockinglösung von **30** (grünblau). Die Seitenketten von **10** sowie **54** befinden sich in der dargestellten Ansicht unterhalb des Grundkörpers. Sie gehen Wechselwirkungen mit Asp102, Asp280 und Asn70 bzw. Val45, Leu68 und Val282 ein. Die Seitenkette von **30** hingegen ist dazu topologisch unterschiedlich orientiert. Sie tastet einen neuen Bereich der Bindetasche ab.

### 3.3.4 Schlussfolgerungen

Es wurde ein neuer, unerwarteter Bindungsmodus eines neuen TGT-Inhibitors (**18**) gefunden. Als Folge des Umklappens einer zur Bindetasche exponierten Peptidbindung wird die ursprünglich in die Bindetasche orientierte Carbonylgruppe vergraben und die benachbarte amidische NH-Gruppe in die Bindetasche gedreht. Zusätzlich wird ein Wassermolekül (W1) eingebaut. Es vermittelt eine günstige Ligand-Protein-Wechselwirkung. Dieses schwer vorhersagbare Verhalten der Bindetasche unterstreicht die Wichtigkeit der Kristallstrukturanalyse als eine Voraussetzung für das erfolgreiche iterative strukturbasierte Wirkstoff-Design. Der neue Bindungsmodus zusammen mit der ambivalenten Donor-Akzeptor-Eigenschaft des Wassermoleküls, eine mögliche Wasserstoffbrücke mit einem Liganden zu bilden, war die Grundlage, drei leicht abweichende Pharmakophor-Hypothesen zu definieren. Ein virtuelles Screening, das auf diesem zusammengesetzten Pharmakophor-Model basierte, brachte eine Vielzahl po-

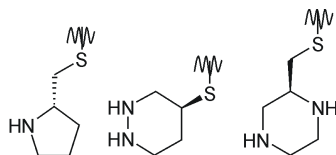
tenzieller TGT-Inhibitoren aus verschiedenen Verbindungsklassen hervor. Aus diesen wurden neun Verbindungen zur experimentellen  $K_i$ -Wert-Bestimmung ausgewählt. Alle getesteten Hits waren im mikromolaren Bereich, zwei sogar im submikromolaren Bereich aktiv. Einige dieser Verbindung besitzen das Potenzial zur weiteren Optimierung und können somit als neue Leitstrukturen dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Optimierung der Pterine weiterverfolgt (Kapitel 3.4.3).

## 3.4 Optimierung von Hits aus dem virtuellen Screening

*Alle in diesem Kapitel vorgestellten neuen Verbindungen wurden von Hans-Dieter Gerber, AK Klebe, Philipps-Universität Marburg, synthetisiert.*

In einer vorangegangenen Arbeit wurde mit einem virtuellen Screening die Verbindung 6-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion (**4**, Tab. 2.2 auf Seite 25) als TGT-Inhibitor entdeckt [Grädler et al., 2001]. Sie inhibiert die *Z. mobilis* TGT im unteren mikromolaren Bereich ( $K_i = 8,3 \mu\text{M}$ ). Durch Anfügen von Resten, die mit Asn70, Asp102 und Asp280 wechselwirken können, wurde versucht, die Affinität zu steigern (**10** und **11** in Tab. 2.2). Anstelle einer Erniedrigung der  $K_i$ -Werte trat aber im Vergleich zum  $K_i$ -Wert von **4** eine Verschlechterung der Bindung ein. Die  $K_i$ -Werte betragen nur 54 (**10**) bzw. 38  $\mu\text{M}$  (**11**). Dies wurde zum einen darauf zurückgeführt, dass durch die Reste keine günstigen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können und zum anderen, dass der Grundkörper aus seiner optimalen Bindungsgeometrie herausgedreht wird.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden deshalb Verbindungen mit aliphatischen Resten vorgeschlagen, die sowohl günstige Wechselwirkungen in der polaren Tasche eingehen können als auch die optimale Bindungsgeometrie des Grundkörpers nicht stören sollen (Abb. 3.14) [Grädler, 2000].



**Abb. 3.14** Aliphatische Reste, die in Grädler [2000] vorgeschlagen wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst versucht, diese Verbindungen zu synthetisieren. Dies war leider nicht erfolgreich. Unter den erforderlichen Reaktionsbedingungen wird der Thiol-Baustein des Edukts oxidiert und entzieht sich somit der Synthese (H.-D. Gerber, persönliche Mitteilung). In der vorangegangenen Arbeit war auch versucht worden, andere aromatischen Reste als die oben beschriebenen als Thiole einzuführen. Auf Grund der durch die Aromaten erniedrigten Nukleophilie des Schwefelatoms gelang dies aber nicht.

Da somit weder aromatische noch aliphatische Substituenten auf einfachem Wege in

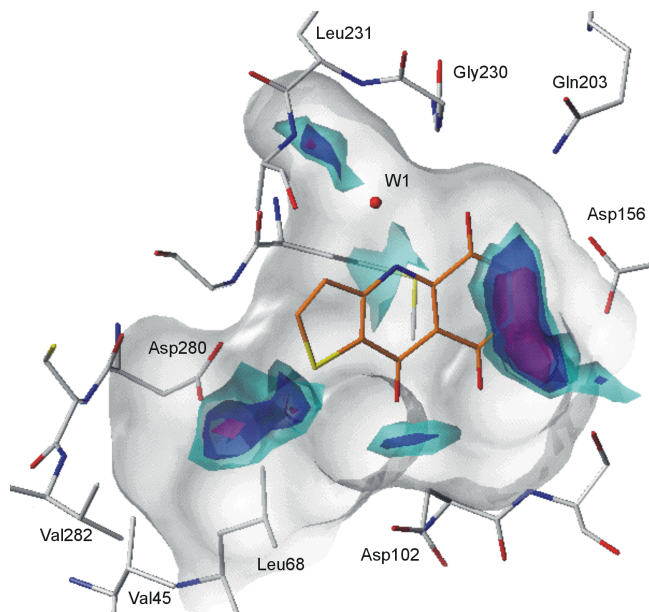
den Grundkörper eingeführt werden konnten, wurde zunächst nach einer synthetisch besser variierbaren Leitstruktur gesucht.

### 3.4.1 Dihydropyridazinochinolintrione

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, brachte ein Screening in der NovoNordisk Compound Database (NNCD) verschiedene Pyridazindione hervor (Tab. 3.5 auf Seite 46). Die beiden affinsten Verbindungen waren **20** und **21** mit  $K_i = 5,0$  bzw.  $4,7 \mu\text{M}$ . Durch Eindiffundieren der Verbindungen in Protein-Kristalle sowie durch Kokristallisationsansätze konnte leider keine Struktur der TGT im Komplex mit den beiden Liganden erhalten werden. Aufgrund des aufgeklärten Bindungsmodus von Inhibitor **18**, der ebenfalls durch dieses Screening gefunden wurde, lässt sich aber ihr Bindungsmodus plausibel modellieren (Abb. 3.7 auf Seite 49). Ligand **20** kann in der Bindetasche der TGT mit **18** so überlagert werden, dass beide Pyridazindion-Einheiten dieselben Wechselwirkungen zum Protein eingehen und das Stickstoffatom des Pyridinonrings von **20** sich an der gleichen Position befindet wie ein Stickstoffatom des Imidazolrings von **18**. Dieses kann dann ebenfalls eine Wasserstoffbrücke mit dem Wassermolekül W1 eingehen. Folglich liegt die gleiche Rückgrat-Konformation an Leu231 und Ala232 vor, wie sie auch in der Kristallstruktur von TGT·**18** gefunden wurde. Der Bindungsmodus von **21** ist wahrscheinlich analog zu dem für **20** postulierten.

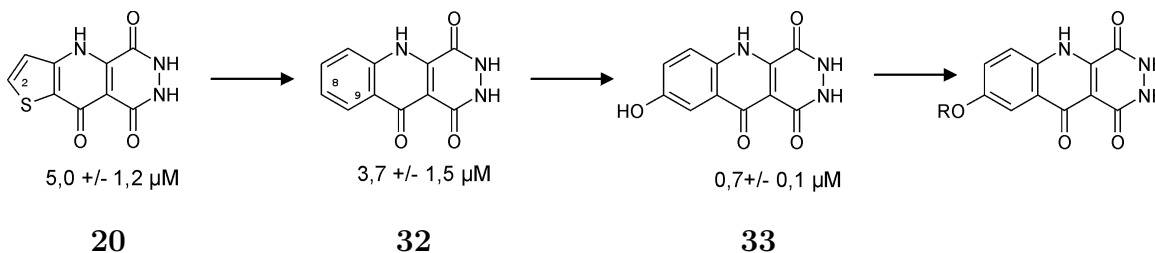
Das Ergebnis einer „Hot Spot“-Analyse (Kapitel 5.4.1) der Bindetasche der TGT mit einer Wasserstoffbrücken-Donor-Sonde ist in Abb. 3.15 gezeigt. Die Donorgruppen von **20** befinden sich im modellierten Bindungsmodus in als günstig berechneten Bereichen. Zusätzlich weist die Analyse bisher nicht adressierte Donor-Felder in der Nähe von Asp102 und Asp280 auf. Durch Modifikation des Grundkörpers mit Substituenten, die mit diesen Asparaginsäuren wechselwirken können, wurde versucht, die Affinität von **20** zu steigern.

Eine Synthese von **20** ist in Luo & Castle [1991] beschrieben. Für eine Optimierung ist aber der Thiophenring in **20** aus zwei Gründen ungeeignet. Zum einen können aus chemischen Gründen an das Schwefelatom selbst keine Reste angebracht werden. Zum anderen können Reste, die an dem zum Schwefelatom benachbarten C2-Kohlenstoff angebracht werden (Abb. 3.16), durch die Geometrie des 5-Rings bedingt, nicht die Bindetasche im Bereich der beiden interessanten Aspartate erreichen, sondern ragen oberhalb davon aus der Tasche heraus. Deshalb wurde zunächst der Thiophenring



**Abb. 3.15** „Hot Spots“ berechnet mit DrugScore für eine Wasserstoffbrücken-Donor-Sonde (N.3). Die Wasserstoffbrücken-Donoren von **20** liegen in als günstig berechneten Bereichen. Zusätzlich befinden sich „Hot Spots“ im Bereich von Asp102 und Asp280 (konturiert auf 80 (grünblau), 84 (blau) und 88 % (violett)).

bioisoster durch einen Phenylring ersetzt (Abb. 3.16). Die Affinität im Vergleich zur Ausgangsverbindung ( $K_i = 5,0 \mu\text{M}$ ) blieb dabei mit  $3,7 \mu\text{M}$  innerhalb der Fehlergrenzen unverändert. Zur Dekoration stehen nun die Positionen 8 und 9 von **32** zur Verfügung.



**Abb. 3.16** Schema, nach dem versucht wurde, die Leitstruktur **20** zu optimieren. Zusätzlich angegeben sind die  $K_i$ -Werte der Verbindungen.

Diese Verbindung wurde durch eine Abwandlung der in Luo & Castle [1991] beschriebenen Synthese erhalten. Als Edukt wurde Anthranilsäure anstelle von Aminothiophencarbonsäure eingesetzt (Abb. 3.17). Durch die Verwendung von Anthranilsäure-Derivaten, die in 5- oder 6-Position substituiert sind, können substituierte Dihydropyridazinochinolintrione erhalten werden. Zur Einführung von Variationen in die Leitstruktur wurde deshalb in der ACD nach Anthranilsäure-Derivaten gesucht, die eine

geeignete Gruppe für weitere Verknüpfungen in den in Frage kommenden Positionen besitzen.

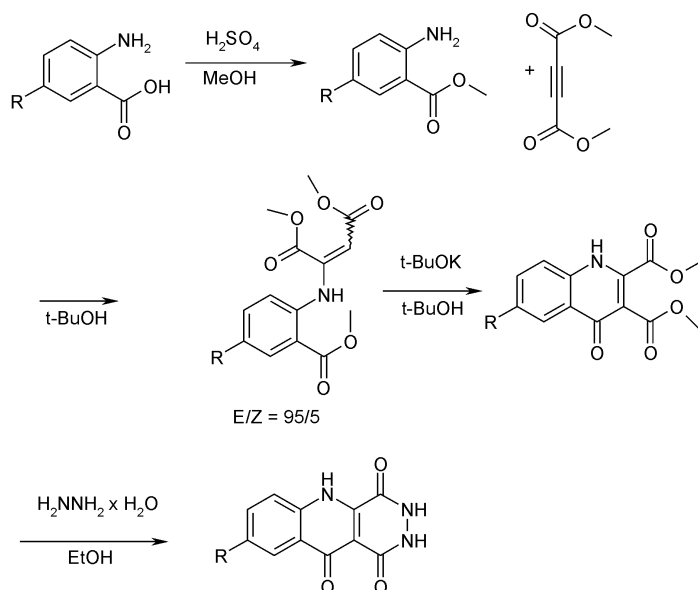


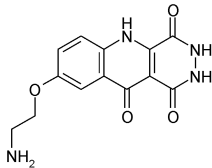
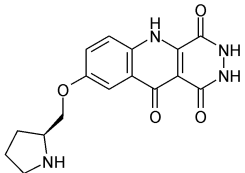
Abb. 3.17 Synthese-Schema zur Darstellung von **32** und dessen Derivaten.

Als geeignetes Derivat wurde 2-Aminohydroxybenzoesäure gefunden. Während die 2-Amino-6-hydroxybenzoesäure synthetisch nur sehr aufwändig zugänglich ist, ist 2-Amino-5-hydroxybenzoesäure kommerziell erhältlich. Dieses Edukt konnte erfolgreich zu **33** (Abb. 3.16) umgesetzt werden. Die so erhaltene Verbindung besitzt bereits einen  $K_i$ -Wert von  $0,7 \mu\text{M}$ . Ihre Hydroxylgruppe kann nun dazu dienen, verschiedene Reste anzubringen. Etwas nachteilig bei dieser Synthesestrategie ist allerdings, dass die Einführung von Substituenten bereits auf der Stufe des Hydroxyanthranilsäureesters erfolgen muss, also auf der zweiten Stufe der Synthese.

### Dihydropyridazinochinolintrion-Derivate

Modellierungen mit SYBYL [SYBYL] und MOLOC [Moloc] haben gezeigt, dass von der Hydroxylgruppe in **33** ausgehend mit einem  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ -Fragment der „Hot Spot“ im Bereich von Asp280 (Abb.3.15) erreicht werden kann. Direkt benachbart zu dieser polaren Aminosäure befindet sich eine lipophile Tasche, die aus Val45, Leu68 und Val282 gebildet wird. Bei der Optimierung von **33** wurde deshalb versucht, durch geeignete Substituenten sowohl eine Wasserstoffbrücke mit Asp280 auszubilden, als auch die lipophile Tasche zu füllen. Die entworfenen Liganden sind in Tab. 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.8 Strukturbasiert entworfene Dihydropyridazinochinolintrione.

Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>34</b>		polymerisiert
<b>35</b>		$9,4 \pm 0,1$

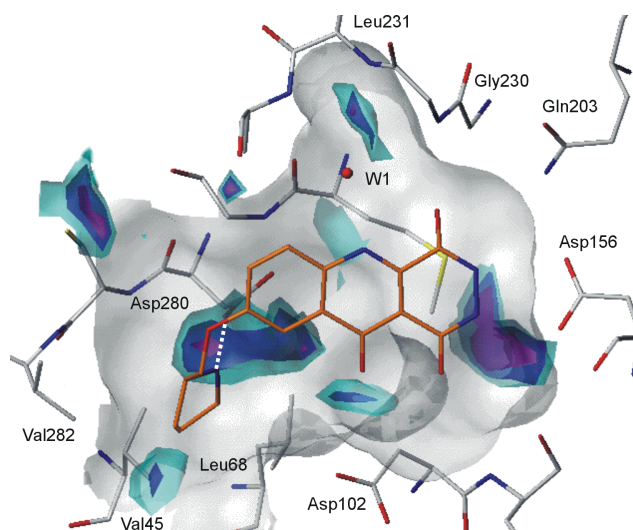
Mit Verbindung **34** sollte zunächst das Design-Konzept überprüft werden, ob mit einem  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ -Fragment der „Hot Spot“ bei Asp280 adressiert werden kann. Verbindung **35** sollte zusätzlich die lipophile Tasche ausfüllen. Der Pyrrolidinrest in dieser Verbindung war zuvor schon zuvor schon als möglicher Substituent zur Optimierung der Dihydrophthalazindione aufgefallen (Abb. 3.14).

Bei der Darstellung von **34** zeigte sich aber, dass diese Verbindung unvorhergesehen-erweise polymerisierte. Vermutlich reagiert die aliphatische Aminogruppe mit der Ketogruppe des Pyridinonrings. Diese Verbindung stand demnach zur Testung nicht zur Verfügung.

Von **35** konnte keine Kristallstruktur im Komplex mit *Z. mobilis* TGT erhalten werden. Der modellierte Bindungsmodus ist in Abb. 3.18 gezeigt. In diesem Bindungsmodus nimmt die Seitenkette des Liganden nach Berechnungen mit MIMUMBA<sup>1</sup> [Klebe & Mietzner, 1994] energetisch günstige Torsionswinkel an (Tab. 3.9). Die Seitenkette geht vermutlich mit dem Stickstoff der Pyrrolidiningruppe eine Wasserstoffbrücke zu Asp280 ein. Der  $pK_a$ -Wert dieser Gruppe beträgt 11,35 [Perrin, 1965]. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass diese Gruppe unter den Assay-Bedingungen (pH 7,3) protoniert vorliegt. Somit sollte die Verbindung eine ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke zu Asp280 ausbilden.

<sup>1</sup>MIMUMBA ist ein Programm zur Generierung von biologisch relevanten Konformationen. Es beruht auf der statistischen Analyse von kleinen Molekülstrukturen, die in der CSD gespeichert sind.

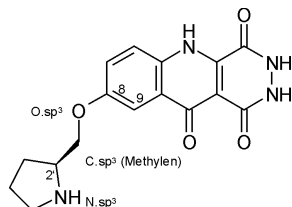




**Abb. 3.18 Modellierter Bindungsmodus von 35.** Das Stickstoffatom der Pyrrolidingruppe befindet sich in einem mit DRUGSCORE als günstig für Wasserstoffbrücken-Donoren vorhergesagten Bereich (konturiert auf 80 (grünblau), 84 (blau) und 88 % (violett)). Im modellierten Bindungsmodus geht dieses Atom eine Wasserstoffbrücke zu Asp280 ein. Die aliphatischen Kohlenstoffe des Restes füllen die lipophile Tasche aus, die aus Val45, Leu68 und Val282 gebildet wird.

Der  $K_i$ -Wert von **35** beträgt nur  $9,4 \mu\text{M}$ . Vom Modell her kann nicht unmittelbar abgeleitet werden, warum durch die Seitenkette die Affinität im Vergleich zu **32** ( $K_i = 3,7 \mu\text{M}$ ) nicht gesteigert werden konnte. Für Beiträge von ladungsverstärkten Wasserstoffbrücken zur Affinität eines Liganden werden Werte von  $-10$  bis  $-20 \text{ kJmol}^{-1}$  angegeben. Das entspricht einer bis zu 3000fachen Affinitätssteigerung [Böhm & Klebe, 1996; Davis & Teague, 1999; Gohlke & Klebe, 2002]. Allerdings sind diese Werte stark von der Umgebung abhängig. Die Beiträge von vergrabenen Wasserstoffbrücken sind wesentlich höher als von oberflächenexponierten. Bei Asp280 handelt es sich um eine gut Wasser zugängliche Aminosäure. Um den vorgeschlagenen Bindungsmodus einzunehmen, muss außerdem ein Wassermolekül, das zu Asp280 eine Wasserstoffbrücke ausbildet, verdrängt werden. Das sollte entropisch günstig sein, kann aber enthalpisch ungünstig werden, da die ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke des Wassermoleküls zu Asp280 zunächst gelöst werden muss. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Asp280 mechanistisch als generelle Säure-Base fungiert (Jeffrey Kittendorf, persönliche Mitteilung). Die Aufgabe von Asp280 wäre es dann, während der Katalyse das freigesetzte Guanin zu protonieren und preQ<sub>1</sub> zu deprotonieren. Asp280 würde folglich überwiegend protoniert vorliegen (Abb. 2.5 auf Seite 15). Ist dies tatsächlich der Fall, wäre der  $pK_a$ -Wert von Asp280 im Vergleich zum durchschnittlichen  $pK_a$ -Wert von Asparaten deutlich erhöht. Rechnungen zur Vorhersage von  $pK_a$ -Werten können dies jedoch

**Tab. 3.9** Torsionswinkel, die die Seitenkette von **35** im modellierten Bindungsmodus einnimmt, im Vergleich zu günstigen Torsionswinkeln, die in Kristallstrukturen kleiner Moleküle gefunden wurden. Der jeweils energetisch günstigste Winkel ist unterstrichen. (Berechnet mit MIMUMBA [Klebe & Mietzner, 1994]).



Torsionswinkel	modellierter Bindungsmodus	energetisch bevorzugt
C.sp <sup>3</sup> (Methylen)-O.sp <sup>3</sup> - C.ar(8)-C.ar(9)	-4°	<u>±180°</u> , ±105°, ±75°, <u>0°</u>
C.sp <sup>3</sup> (C2')-C.sp <sup>3</sup> (Methylen)- O.sp <sup>3</sup> -C.ar(8)	-95°	<u>-180°</u> , ±90°
O.sp <sup>3</sup> -C.sp <sup>3</sup> (Methylen)- C.sp <sup>3</sup> (C2')-N.sp <sup>3</sup>	67°	±180°, <u>±60°</u>

nicht bestätigen (Ingo Dramburg, persönliche Mitteilung). Diese Rechnungen wurden allerdings ohne tRNA durchgeführt, da deren Bindungsmodus nicht bekannt ist. Es ist denkbar, dass erst durch die tRNA-Bindung der  $pK_a$ -Wert dieser Aminosäure verändert wird.

Bei den angestellten Überlegungen ist einige Vorsicht geboten, weil der Bindungsmodus von **35** nicht experimentell bestimmt werden konnte. Denkbar wäre auch, dass die Pyrrolidingruppe nicht in die Bindetasche zu Asp280 hineinragt, sondern aus ihr heraussteht. Eine ähnliche Seitenketten-Konformation wurde für Verbindung **65** (Tab. 3.17 auf Seite 104), die ebenfalls eine geladene Aminogruppe besitzt, gefunden (Abb. 3.39 auf Seite 107).

Eine Überprüfung, ob sich eventuell der lipophile Teil der Pyrrolidingruppe negativ auf die Bindungsenergie auswirkt, war mit dem Dihydropyridazinochinolintrion-Grundkörper nicht möglich, weil die entsprechende Verbindung (**34**) polymerisierte. Deshalb wurde nach einem chemisch weniger reaktiven Grundgerüst gesucht.

### 3.4.2 Tetraazaanthrazendion

Wie im vorangegangenen Kapitel dargestellt, konnte das Design-Konzept, durch Anfügen eines CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Fragments an **33** den „Hot Spot“ im Bereich von Asp280 zu erreichen und dadurch eine Steigerung der Bindungsaffinität zu erzielen, nicht überprüft werden, weil die entsprechende Verbindung (**34**) polymerisierte. Wahrscheinlich reagiert die aliphatische Aminogruppe mit der Carbonylgruppe des Pyridinonrings. Im modellierten Bindungsmodus der Leitstruktur (**20**, Abb. 3.15) geht diese Carbonylgruppe keine Wechselwirkungen mit Aminosäuren der Bindetasche ein. Es sollte deshalb möglich sein, auf die Carbonylgruppe zu verzichten, ohne dabei an Affinität zu verlieren. Eine zu **32** analoge Verbindung ohne diese Carbonylgruppe ist Tetraazaanthrazendion (**36**, Abb. 3.19). Im Vergleich zu **32** ist in dieser Verbindung der Pyridinonring durch einen Pyrazinring ersetzt. Dadurch ist aus dem als Wasserstoffbrücken-Donor fungierenden Pyridinon-Stickstoff ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor geworden. Dieser Teil des Moleküls geht vermutlich eine Wasserstoffbrücke zu W1 ein (Abb. 3.7). Da dieses Wassermolekül sowohl als Wasserstoffbrücken-Donor als auch als Akzeptor in Bezug auf den Liganden fungieren kann (Abb. 3.10.II und .III auf Seite 53), sollte diese Veränderung ebenfalls die Affinität nicht wesentlich beeinflussen.

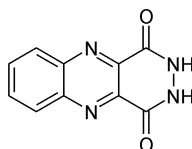


Abb. 3.19 2,3-Dihydro-2,3,9,10-tetraazaanthrazen-1,4-dion (**36**)

Verbindung **36** wurde wie in Chattaway & Humphrey [1929] beschrieben synthetisiert. Ihr  $K_i$ -Wert beträgt  $5,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$  und ist damit im Vergleich zur Leitstruktur **20** ( $K_i = 5,0 \mu\text{M}$ ) unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen unverändert. Dies zeigt, dass die Überlegung, dass die Carbonylgruppe von **20** keinen relevanten Beitrag zur Affinität liefert, richtig ist. Leider waren aber die Ausbeuten der Synthese nur sehr gering. Diese Verbindung war deshalb für eine weitere Optimierung ungeeignet.

### 3.4.3 Pterine

In den beiden vorangegangenen Kapiteln wurden Dihydropyridazinochinolintrion und Tetraazaanthrazendion als Leitstrukturen für TGT-Inhibitoren beschrieben. Bei beiden

Verbindungsklassen sind aber unerwartete Probleme bei der Stabilität der Verbindung bzw. der Synthese aufgetreten. Die Verbindungsklasse der Dihydropyridazinochinolintrione hat den Nachteil, dass die Carbonylgruppe des Pyridinonrings mit aliphatischen Aminen reagiert und es so zu einer unerwünschten Polymerisation kommt (Kapitel 3.4.1). Eine Synthese für eine analoge Verbindung ohne diese Carbonylgruppe (Tetraazaanthrazendion) wurde zwar bereits veröffentlicht, aber die erzielten Ausbeuten sind für eine weitere Optimierung zu gering (Kapitel 3.4.2). Beide Verbindungsklassen eignen sich somit nicht für eine weitere Optimierung auf TGT-Inhibition. Es wurde deshalb nach einer weiteren Leitstruktur gesucht.

Mit einem virtuellen Screening-Lauf basierend auf einem neuen Bindungsmodus (Kapitel 3.3) sind Pterine als potente TGT-Inhibitoren gefunden worden (Tab. 3.7 auf Seite 58). Phenylpterin (**25**) hat einen  $K_i$ -Wert von  $3,8 \mu\text{M}$ , Pterin selbst (**24**) von  $0,6 \mu\text{M}$  und 6-Methylpterin (**23**) von  $0,25 \mu\text{M}$ . Die letztgenannte Verbindung ist der affinste Ligand, der durch dieses virtuelle Screening entdeckt wurde.

Pterin ist in einer einstufigen Reaktion von 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin mit Glyoxal (Abb. 3.20) einfach chemisch zugänglich [Mowat et al., 1948]. Werden anstelle von Glyoxal substituierte Aldehyde eingesetzt, so entstehen Pterine, die in 6- oder 7-Position derivatisiert sind [Storm et al., 1971]. Die Reaktion zum gewünschten Isomer kann durch geeignete Reaktionsbedingungen gesteuert werden.

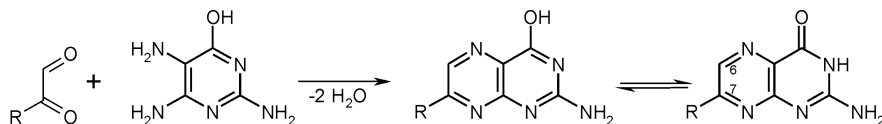


Abb. 3.20 Synthese von Pterinen.

Die  $K_i$ -Werte der Pterine **23** - **25** liegen bereits im unteren mikromolaren und submikromolaren Bereich. Das stellt eine sehr gute Ausgangsbedingung für die weitere Optimierung dar [Verlinde & Hol, 1994]. Außerdem ist diese Stoffklasse offensichtlich leicht zu derivatisieren. Mehr als 60 Derivate mit einer Substitution in 7-Position sind in der aktuellen Ausgabe der BEILSTEIN-Datenbank gespeichert (Stand Okt. 2002). Diese beiden Kriterien zusammengekommen machen Pterin zu einer interessanten Leitstruktur für neue Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT.

Es ist nicht gelungen, die Kristallstruktur von Pterinen im Komplex mit TGT aufzuklären. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die extrem schlechte Wasserlöslichkeit [Albert

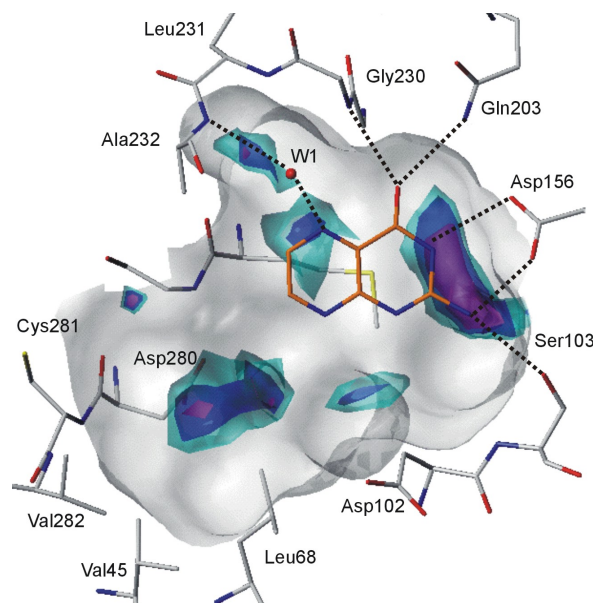
et al., 1952]. Vermutlich nimmt Pterin denselben Bindungsmodus wie **18** (Abb. 3.6 auf Seite 47) im aktiven Zentrum der *Z. mobilis* TGT ein (Kapitel 3.3.3). Der modellierte Bindungsmodus ist in Abb. 3.21 dargestellt. In diesem Bindungsmodus liegen die Wasserstoffbrücken-Donoren der Verbindung in als günstig für Donoren vorhergesagten Bereichen.

In Kapitel 3.5 werden TGT-Kristallstrukturen im Komplex mit Chinazolinonen beschrieben. Bei der Analyse der Strukturen ist aufgefallen, dass sich die Seitenkette von Asp102 bei bestimmten Liganden bei pH 8,5 (Abb. 3.27 auf Seite 84, 3.31.III auf Seite 90 und 3.44.II auf Seite 113) sowie bei allen Liganden bei pH 5,5 (Kapitel 3.5.4) zum Liganden dreht. Unter der Annahme, dass der Ligand an der Pyrimidin-Teilstruktur des Chinazolinon-Gerüsts protoniert vorliegt, geht die terminale Carboxylatgruppe eine gegabelte Wasserstoffbrücke mit ihm ein (Abb. 3.36). Dieser Pyrimidin-Baustein ist formal auch in Pterin enthalten. Allerdings beträgt der  $pK_a$ -Wert dieses Bausteins in Pterin lediglich 2,3 [Albert et al., 1952]. Er liegt deutlich tiefer als in Chinazolinonen ( $\approx 3,5 - 4,5$ , Tab. 3.19 auf Seite 114). Deshalb ist es fraglich, ob bei der Bindung von Pterin mit einer Rotation der Seitenkette von Asp102 hin zum Liganden zu rechnen ist.

Im vorgeschlagenen Bindungsmodus werden die ausgezeichneten „Hot Spots“ im Bereich von Asp102 und 280 sowie die lipophile Subtasche, die aus Val45, Leu68, Cys281 und Val282 gebildet wird, nicht adressiert. Durch Substituenten in 6-Position können diese Bereiche erreicht werden.

### Design von Pterin-Derivaten

Im ersten Design-Zyklus sollten durch eine einfache Synthese schnell unterschiedliche Inhibitoren erhalten werden. Ein einfacher Zugang zu dieser Stoffklasse ist die Reaktion von 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin mit substituierten Aldehyden (Abb. 3.20). Allerdings können durch diese Reaktion Konstitutionsisomere entstehen. Das Produkt kann sowohl in 6- als auch in 7-Position substituiert sein. Durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen kann die Reaktion gesteuert werden. Die Bedingungen sind vom jeweiligen Aldehyd abhängig und müssen somit für jede Reaktion neu herausgefunden werden. Dies steht einem schnellen Zugang der Derivate im Wege. Deshalb wurde zunächst als Grundkörper ein Pterin ausgewählt, welches bereits eine kurze Seitenkette in 7-Position enthält. Durch Derivatisierung der Seitenkette können dann geeignete Reste angeknüpft werden. Das Problem der Konstitutionsisomere wird so umgangen. Die Seitenkette mit „Linker“ sollte möglichst kurz sein, damit der daran angeknüpft



**Abb. 3.21 Modellierter Bindungsmodus von 24.** Die Donorgruppen der Verbindung liegen in als günstig für Wasserstoffbrücken-Donoren vorhergesagten Bereichen. (Berechnet mit DRUGSCORE (N.3-Sonde), konturiert auf 80 (grünblau), 84 (blau) und 88 % (violett).) Nicht adressiert werden die ausgezeichneten „Hot Spots“ im Bereich von Asp102 und Asp280 sowie die lipophile Subtasche, die aus Val45, Leu68, Cys281 und Val282 gebildet wird.

te Rest in die Bindetasche ragt und nicht aus ihr heraus. Die drei Derivate mit der kürzesten Seitenkette in der BEILSTEIN-Datenbank sind 7-Chloro-, 7-Hydroxy- und 7-Methylpterin. Das Chlorderivat ist ungeeignet, da ein Chloratom nur schlecht substituiert werden kann. Für die Hydroxyverbindung wurde keine geeignete Synthesvorschrift gefunden. Für 7-Methylpterin hingegen ist eine Synthese ausgehend von Methylglyoxal beschrieben [Storm et al., 1971]. Eine Vorschrift zur Bromierung der Seitenkette wurde ebenfalls veröffentlicht [Waller et al., 1952]. Des weiteren existiert eine Literaturvorschrift zur Umsetzung der nahe verwandten Verbindung 2,4-Diamino-6-bromomethylpteridin mit verschiedenen S- und O-Nukleophilen [Fröhlich et al., 1999]. Die besten Ausbeuten wurden dabei erwartungsgemäß mit der Reaktion mit S-Nukleophilen erzielt (67 % für S-Nukleophile gegenüber 8 - 50 % für O-Nukleophile). Durch eine Kombination der drei Synthesen sollte es möglich sein, einfach Pterinderivate zu erhalten (Abb. 3.22). Sehr günstig für einen direkten Zugang für Derivate ist, dass die Variation erst im letzten Schritt eingeführt wird. Um gute Ausbeuten zu erzielen, wurden nur aliphatische Thiol-Derivate berücksichtigt.

Zur Entwicklung von Ideen für Substituenten wurde die ACD [ACD] nach geeigneten Thiolen durchsucht. Dabei wurde nach einem hierarchischen Protokoll vorgegangen.

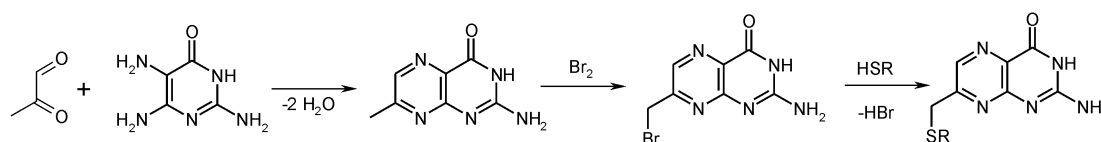


Abb. 3.22 Synthesestrategie für Pterin-Derivate mit einer Substitution in 7-Position.

Im ersten Schritt wurde mit UNITY/ SELECTOR nach aliphatischen Thiolen (SLN<sup>2</sup>: SHCH) gefiltert. Dieses Kriterium erfüllten 701 von 215.212 Verbindungen. Im zweiten Schritt wurde in dieser Hitliste nach Verbindungen gesucht, die genau einer Thiolgruppe enthalten sowie ein Molekulargewicht kleiner 300 Dalton besitzen und nicht mehr als sechs drehbaren Bindungen aufweisen. Diese Kriterien wurden zum einen gewählt, um Nebenreaktionen bei der Synthese zu vermeiden, zum anderen, um nicht zu große und flexible Verbindungen als Produkte zu erhalten [Hann et al., 2001; Oprea et al., 2001]. Nach dieser Suche verblieben 204 Verbindungen. Das Herausfiltern von Duplikaten reduzierte die Zahl letztendlich auf 148 Hits.

Die gefundenen Fragmente wurden mit einem SPL-Skript<sup>3</sup> mit 7-Methylpterin zu potenziellen Inhibitoren verknüpft. Die dadurch erhaltenen Verbindungen wurden in die *Z. mobilis* TGT-Bindetasche in der Orientierung, wie sie in TGT·18 vorliegt (Abb. 3.10), mit FLEXX [Rarey et al., 1996] eingepasst. Für 144 Verbindungen wurde eine Docking-Lösung gefunden.

Die drei Verbindungen, die von DRUGSCORE [Gohlke et al., 2000a] am besten bewertet wurden, sind in Tab. 3.10 aufgeführt. Diese Verbindungen sind sehr groß. In dem von FLEXX vorgeschlagenen Bindungsmodus ragt ein großer Teil der Seitenkette aus der Bindetasche heraus. Zudem besitzen diese Verbindungen ein relativ hohes Molekulargewicht. Das niedrigste Molekulargewicht der vorgeschlagenen Derivate beträgt 223,24 Dalton, das höchste liegt bei 458,46 Dalton. Das Molekulargewicht der Verbindungen auf Rang 1 - 3 ist jeweils größer als 420 Dalton. Damit gehören sie zu den 18 schwersten Verbindungen auf dieser Hitliste.

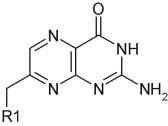
Der Scoring-Wert von DRUGSCORE ist die Summe aller Protein-Ligand-Kontakte im Bereich von 1 bis 6 Å (Kapitel 5.4.1.2, [Gohlke et al., 2000b]). Dadurch ist die Bewertung abhängig von der Anzahl der Ligandatome und damit von der Größe der Moleküle. In einer Studie zum Vergleich verschiedener Bewertungsfunktionen wurde deshalb zum Ausgleich der Term für rotierbare Bindungen, der in der FLEXX-Scoring-Funktion enthalten ist [Böhm, 1994], dazu addiert [Stahl & Rarey, 2001]. Dieser Term nimmt in der

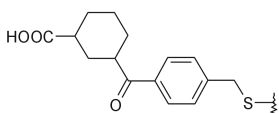
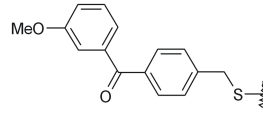
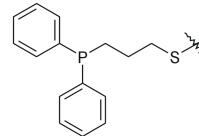
<sup>2</sup>SLN: Sybyl Line Notation; Kurzschreibweise für Moleküle

<sup>3</sup>SPL: SYBYL Programming Language; Skript-Sprache in SYBYL

Regel mit der Größe von wirkstoffähnlichen Molekülen zu. Um kleine Verbindungen, die eine gute Bewertung von DRUGSCORE erhalten haben, im vorderen Bereich der Hitliste anzureichern, wurde deshalb in dieser Studie die Bewertung von DRUGSCORE auf das Molekulargewicht der Verbindung bezogen. Nach diesem Bewertungsverfahren befinden sich die Verbindungen **37** - **39** nur noch auf den Rängen 102, 105 und 92. Auf den vorderen Rängen hingegen liegen nun sehr interessante kleinere Moleküle (Tab. 3.11).

**Tab. 3.10** Liste der drei Verbindungen, die von DrugScore am besten bewertet wurden.



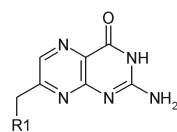
Nr.	Rest (R1)	DrugScore (Rang)	Molekulargewicht	DS/MW × 100 (Rang)
<b>37</b>		-66,00 (1)	452,51	-14,59 (103)
<b>38</b>		-63,63 (2)	433,49	-14,54 (105)
<b>39</b>		-63,09 (3)	421,46	-14,97 (92)

Aus dieser neu sortierten Hitliste wurden Verbindungen zur Synthese und anschließender Bestimmung der  $K_i$ -Werte nach folgenden Kriterien ausgesucht:

- Synthetisierbarkeit,
- Komplementarität zwischen Ligand- und Proteinoberfläche,
- Fehlen von ungünstigen van der Waals-Wechselwirkungen nach der Minimierung mit MOLOC,
- Diversität der Reste und
- gute Bewertung durch DRUGSCORE-Score nach der Skalierung.



Tab. 3.11 Liste von Verbindungen, die nach einer Skalierung des DrugScore-Scores auf das Molekulargewicht am besten bewertet wurden.



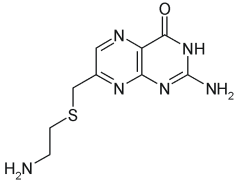
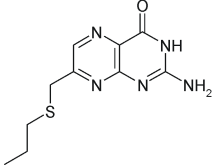
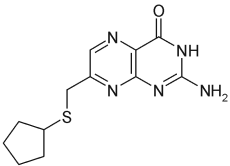
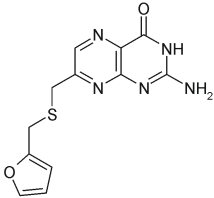
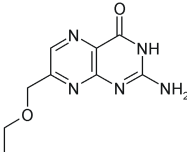
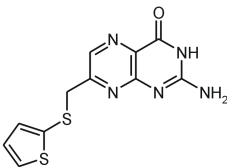
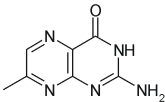
Nr.	Rest (R1)	DrugScore (Rang)	Molekulargewicht	DS/MW × 100 (Rang)
40		-45,51 (130)	253,30	-17,96 (1)
41		-44,94 (132)	251,30	-17,88 (2)
42		-44,28 (136)	249,29	-17,76 (3)
43		-47,18 (110)	266,28	-17,72 (4)
44		-46,97 (112)	265,29	-17,71 (5)
45		-46,72 (119)	266,26	-17,55 (9)
46		-48,55 (74)	277,35	-17,51 (11)

Die ausgewählten Verbindungen (**40**, **41**, **46** und **47**) sind in Tab. 3.12 aufgeführt. Zudem haben Modellierungen mit MOLOC ergeben, dass **49** eine viel versprechende Verbindung ist. Diese Verbindung wurde durch das Computerdesign nicht vorgeschlagen, weil da nur aliphatische Thiole berücksichtigt worden sind. Verbindung **48** ist als Nebenprodukt in der Synthese angefallen. Sie wurde ebenfalls getestet.

Überraschenderweise ist der  $K_i$ -Wert des 7-Methylpterin-Grundkörpers (**50**) mit  $K_i = 5,6 \mu\text{M}$  eine Größenordnung schlechter als der von **24** (Pterin). Modellierungen in MOLOC zeigen jedoch keine ungünstigen Wechselwirkungen für die Methylgruppe.

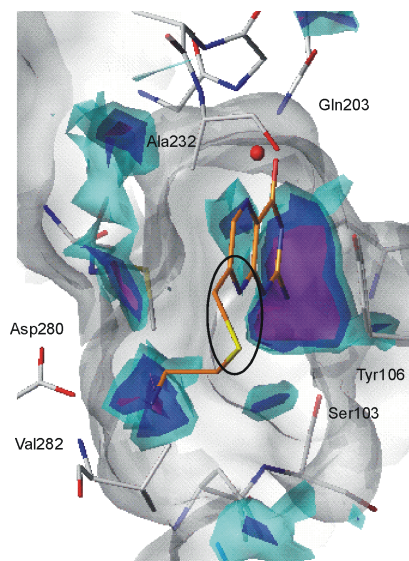
Der von FLEXX vorgeschlagenen Bindungsmodus für **40** ist in Abb. 3.23 gezeigt. In diesem Bindungsmodus geht die Aminogruppe von **40** eine Wasserstoffbrücke zu Asp280 ein. Die  $K_i$ -Werte der Verbindungen **40** (Aminoethyl-Substituent), **41** (Propyl-Substituent) und **46** (Cyclopentyl-Substituent) fallen mit  $K_i = 3,4$ ,  $7,9$  bzw.  $5,2 \mu\text{M}$  unter Berücksichtigung der Fehler jedoch in denselben Bereich wie der des unsubstituierten 7-Methylpterins. Offensichtlich vermag die vermutlich sogar ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke der terminalen Aminogruppe von **40** mit Asp280 die Affinität

Tab. 3.12 Liste von Verbindungen, die synthetisiert und anschließend auf TGT-Inhibition getestet wurden.

Nr.	Formel	DrugScore (Rang)	DS/MW×100 (Rang)	$K_i$ [ $\mu$ M ]
40		-45,51 (130)	-17,96 (1)	$3,4 \pm 0,4$
41		-44,94 (132)	-17,88 (2)	$7,9 \pm 1,9$
46		-48,55 (74)	-17,51 (11)	$5,2 \pm 0,8$
47		-48,32 (79)	-16,70 (35)	*)
48		-39,49	-17,85	$6,7 \pm 0,9$
49		-45,39	-15,58	$0,45 \pm 0,05$
50		-36,41	-20,55	$5,6 \pm 1,7$

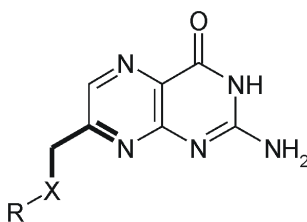
\*) Synthese ist noch in Arbeit.

nicht zu steigern. Auch lipophile Reste zeigen keinen positiven Einfluss. Derselbe Effekt wurde auch beim Versuch, die Affinität von Chinazolinonen zu steigern (Kapitel 3.5), beobachtet.



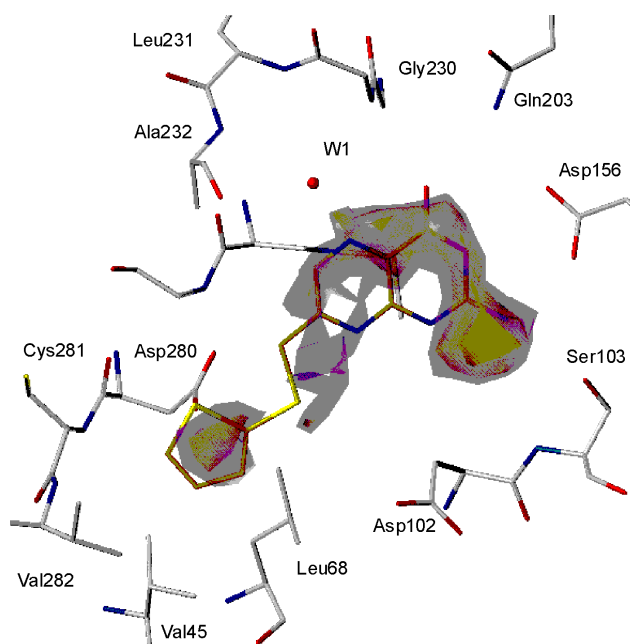
**Abb. 3.23 Dockinglösung (Rang 1) von 40.** Um den Wasserstoffbrücken-Donor „Hot Spot“ bei Asp280 zu erreichen (berechnet mit DRUGSCORE (N.3-Sonde), konturiert auf 80 (grün-blau), 84 (blau) und 88 % (violett), nimmt die Verbindung für den Torsionswinkel N.ar-C.ar-C.sp<sup>3</sup>-S.sp<sup>3</sup> einen ungünstigen Wert von ca 30° ein.

Laut MIMUMBA sind für den Torsionswinkel N.ar-C.ar-C.sp<sup>3</sup>-S.sp<sup>3</sup> (Abb. 3.24) 0°, 90° und 180° bevorzugte Konformationen, wobei 90° deutlich am günstigsten ist. Dieser günstige Torsionswinkel kann von den Pterinderivaten auf Grund ungünstiger sterischer Wechselwirkungen mit Tyr106 auf der einen und Gly261 auf der anderen Seite in der Bindetasche der *Z. mobilis* TGT nicht eingenommen werden. Die Pterin-Derivate **40**, **41** und **46** können aber alle einen Torsionswinkel von 0° einnehmen. In dieser Konformation kann die aliphatische Aminogruppe von **40** aber keine Wasserstoffbrücke zu Asp280 eingehen. Dazu müsste das Schwefelatom in Verbindung **40** aus einer günstigen Konformation herausgedreht werden und der Torsionswinkel N.ar-C.ar-C.sp<sup>3</sup>-S.sp<sup>3</sup> einen ungünstigen Wert von ca 30° einnehmen (Abb. 3.23). Das könnte ein Grund dafür sein, warum eine, möglicherweise sogar ladungsunterstützte, Wasserstoffbrücke zu Asp280 in dieser Verbindung nicht zu einer Affinitätssteigerung führt.



**Abb. 3.24 Torsionswinkel N.ar-C.ar-C.sp<sup>3</sup>-X.** Bevorzugte Konformationen für X = S sind 0°, 90° und 180°, für X = O 0°, 75°, 90° und 180° sowie für X = N 0°, 45°, 90°, 120° und 150°.

Die affinste Verbindung dieser Serie ist **49**. Ihr  $K_i$ -Wert ist mit  $0,45 \mu\text{M}$  um mehr als eine Größenordnung niedriger als der von 7-Methylpterin (**50**). Er fällt in denselben Bereich wie der von Pterin (**24**). Der in MOLOC modellierte Bindungsmodus sowie DRUGSCORE-„Hot Spots“, berechnet mit einer C.ar-Sonde, sind in Abb. 3.25 dargestellt. Der Thiophenring dieser Verbindung liegt exakt in einem Bereich, der von DRUGSCORE als günstig für aromatische Kohlenstoffe vorhergesagt wird. Im nächsten Design-Zyklus könnten daher durch den Austausch des Thiophenrings gegen andere Aromaten die molekularen Erkennungseigenschaften dieser Subtasche weiter abgetastet werden.



**Abb. 3.25 Modellierter Bindungsmodus von 49.** Der Thiophenring dieser Verbindung liegt exakt in einem Bereich, der von DRUGSCORE als günstig für aromatische Kohlenstoffe vorhergesagt wird (konturiert auf 89 (violett), 91 (orange) und 95 % (gelb)).

Die Ethoxy-Verbindung **48** ist als Nebenprodukt in der Synthese angefallen. Ihr  $K_i$ -Wert fällt mit  $6,7 \mu\text{M}$  ebenfalls in denselben Bereich wie der des Grundkörpers. Auch wenn ein direkter Vergleich zu **41** nicht gezogen werden kann, weil diese Verbindung statt der Ethyl- eine Propylgruppe enthält, so scheint doch die Substitution des Schwefels gegen Sauerstoff in diesem Fall keinen gravierenden Einfluss auf die Affinität auszuüben. Im Vergleich zu Schwefel verlangt eine N.ar-C.ar-C.sp<sup>3</sup>-O.sp<sup>3</sup>-Kette andere günstige Torsionswinkel ( $0^\circ$ ,  $75^\circ$ ,  $90^\circ$  und  $180^\circ$ ), wobei  $180^\circ$  der energetisch bevorzugteste ist (Abb. 3.24). Die C-O-Bindung ist im Vergleich zur C-S-Bindung etwa  $0,4 \text{ \AA}$  kürzer. Dieser Unterschied in der Bindungslänge ermöglicht es, dass in 7-Oxymethyl-

Pterinen im Gegensatz zu 7-Sulfanylmethyl-Pterinen der Torsionswinkel N.ar-C.sp<sup>3</sup>-C.ar-X (X = O bzw. S) 90° einnehmen kann, ohne dass es zu sterischen Konflikten mit den umgebenden Aminosäuren kommt. Ein Torsionswinkel von 75° ist ebenfalls sterisch erlaubt. Somit ermöglicht eine Oxymethyl-Gruppe im Gegensatz zu einer Sulfanylmethyl-Gruppe eine größere konformative Freiheit der Pterine in der Bindetasche der TGT. Da außerdem zahlreiche Alkohole in der ACD gespeichert sind, könnte im nächsten Design-Zyklus deshalb versucht werden, durch Oxymethyl-Pterine die Affinität des Grundkörpers weiter zu steigern.

Interessant wäre es auch, das Schwefelatom der Seitenkette durch ein Stickstoffatom zu ersetzen. Zum einen können dadurch andere Konformationen der Seitenkette erreicht werden, denn günstige Torsionswinkel für N.ar-C.ar-C.sp<sup>3</sup>-N.sp<sup>3</sup> sind 0°, 45°, 90°, 120° und 150° (Abb. 3.24), wobei der günstigste Torsionswinkel 90° beträgt. Allerdings sind die Energieunterschiede zwischen den einzelnen Konformationen sehr gering. Zum anderen haben Modellierungen mit MOLOC gezeigt, dass über das Stickstoffatom Wasser verbrückte Wechselwirkungen zum Protein ausgebildet werden können. Allerdings muss für diesen Verbindungstyp eine neue Synthese erarbeitet werden. Bei dem Versuch, 7-[(2-aminoethylamino)-methyl]-Pterin analog zu 7-[(2-aminoethylsulfanyl)-methyl]-Pterin zu synthetisieren, wurde ein Gemisch zahlreicher Produkte erhalten. Das gewünschte Produkt konnte aber nicht isoliert werden (Hans-Dieter Gerber, persönliche Mitteilung). Ein möglicher Ansatz wäre es, anstelle von **50** 7-Formylpterin zu synthetisieren. Durch reduktive Aminierung könnte dann das gewünschte Produkt erhalten werden. Eine Vorschrift zur Synthese von 7-Formylpterin ist bereits beschrieben [Taylor & Dumas, 1981].

#### 3.4.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Ausgehend von Hits aus dem virtuellen Screening (Kapitel 3.3) wurde versucht, Liganden auf TGT-Inhibition zu optimieren.

In Verbindung **20** wurde zunächst der Thiophenring bioisoster gegen einen Benzolring ausgetauscht (**32**). Anschließend wurde eine Hydroxylgruppe als „Linker“ eingefügt (**33**). Diese Verbindung besitzt bereits einen  $K_i$ -Wert von 0,7  $\mu$ M. Zur Optimierung wurde weiter versucht, einen Wasserstoffbrücken-Donor-„Hot Spot“ zu adressieren, der sich in der Nähe von Asp280 befindet (Abb. 3.15). Die Synthese einer Verbindung, die einen Pyrrolidinring enthält (**35**), ist gelungen. Allerdings konnte durch diese Substi-

tution die Affinität nicht gesteigert werden. Beim Versuch, anstelle des Pyrrolidinrings eine Aminoethoxy-Gruppe anzufügen, polymerisierte die Verbindung (**34**). Vermutlich reagiert die terminale Aminogruppe mit der Carbonylgruppe des Pyridinonrings. Ein analoger Grundkörper ohne diese Carbonylgruppe (**36**) konnte nach einer Literaturvorschrift ebenfalls synthetisiert werden (Kapitel 3.4.2). Allerdings waren die Ausbeuten gering, so dass er für eine weitere Optimierung nicht geeignet war.

Die affinste Stoffklasse, die bei dem vorangegangenen virtuellen Screening gefunden worden war, war die der Pterine (Kapitel 3.3). Pterin (**24**) und 6-Methylpterin (**23**) sind bereits im submikromolaren Bereich aktiv. Da diese Stoffe in wenigen Schritten synthetisiert werden können (Abb. 3.20), wurde versucht, durch geeignete Derivate die Affinität von Pterin zu steigern. Als Ausgangsverbindung diente 7-Methylpterin (**50**). Aus nicht eindeutig erklärbaren Gründen ist dessen Affinität im Vergleich zu **23** um ca. eine Größenordnung schlechter.

Eine Suche in der ACD erbrachte einige interessante Fragmente zur Anknüpfung an den Pterin-Grundkörper. Aliphatische Reste (**41**, **46**) konnten die Affinität jedoch nicht steigern. Auch eine Aminoethyl-Gruppe (**40**) brachte keinen positiven Einfluss auf die Bindungsenergie. Dies wurde auch für Verbindung **35** beobachtet. Beide Verbindungen können im modellierten Bindungsmodus eine, vermutlich sogar ladungsunterstützte, Wasserstoffbrücke zu Asp280 ausbilden (Abb. 3.18 und 3.23). Von solch einer Wechselwirkung kann eine Affinitätssteigerung um bis zu Faktor 3000 erwartet werden [Böhm & Klebe, 1996; Davis & Teague, 1999; Gohlke & Klebe, 2002]. Dies ist aber hier nicht der Fall. Bei Verbindung **40** kann spekuliert werden, dass konformative Effekte dafür verantwortlich sind. Die Seitenkette in dieser Verbindung muss ungünstige Torsionswinkel einnehmen, um mit Asp280 wechselwirken zu können. Für **35** trifft diese Erklärung nicht zu. In diesem Fall nimmt die Seitenkette energetisch günstige Torsionswinkel ein. Es gibt aber Hinweise darauf, dass Asp280 mechanistisch als generelle Säure-Base funktioniert (Jeffrey Kittendorf, persönliche Mitteilung). Die Aufgabe von Asp280 wäre es dann, während der Katalyse preQ<sub>1</sub> zu deprotonieren. Asp280 würde bei diesem Vorgang selbst protoniert werden (Abb. 2.5 auf Seite 15). Ist dies tatsächlich der Fall, wäre der  $pK_a$ -Wert von Asp280 im Vergleich zum durchschnittlichen  $pK_a$ -Wert dieser Aminosäure vermutlich deutlich erhöht. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür liefern, warum eine Wasserstoffbrücke zu Asp280 keine Affinitätssteigerung erbrachte. Rechnungen zur Vorhersage von  $pK_a$ -Werten können diese Überlegung jedoch nicht stützen (Ingo Dramburg, persönliche Mitteilung). Die getroffene Erklärung ist aber

mit gewisser Vorsicht zu betrachten, weil der Bindungsmodus dieser Liganden nicht experimentell bestimmt werden konnte.

Das affinste Pterin-Derivat dieses Design-Zyklus ist **49** mit einem  $K_i$ -Wert von  $0,45 \mu\text{M}$ . Der Thiophenring in dieser Verbindung liegt exakt in einem als günstig für aromatische Kohlenstoffe vorhergesagten Bereich (Abb. 3.25). Im nächsten Design-Zyklus könnten durch den Austausch des Thiophenrings gegen andere Aromaten die molekularen Erkennungseigenschaften dieser Subtasche weiter abgetastet werden.

Im Gegensatz zu der Stoffklasse der Dihydropyridazinochinolintrione ist es bei der Stoffklasse der Pterine gelungen, eine Synthese zu etablieren, die in nur drei Schritten einen Zugang zu Pterin-Derivaten liefert. Der Vorteil dieser Synthese ist zusätzlich, dass die Variation erst in der letzten Stufe erfolgt, so dass auf schnellem und direktem Weg diverse Derivate erhalten werden können. Im ersten Design-Zyklus der Pterinderivate wurden nur aliphatischen Thiole als Edukte in einer Datenbanksuche berücksichtigt. Die Erfahrungen, die bei der Synthese der in Tab. 3.12 aufgeführten Verbindungen gemacht wurden, haben aber gezeigt, dass auch aromatische Thiole sowie Hydroxylgruppen gut mit der bromierten Zwischenstufe reagieren. Für den zweiten Design-Zyklus empfiehlt es sich deshalb, auch solche Verbindungen einzubeziehen. Modellierungen haben zudem ergeben, dass auch ein Ersatz des Schwefelatoms gegen ein Stickstoffatom zu interessanten Derivaten führen kann, da über das Stickstoffatom vermutlich Wasser verbrückte Wechselwirkungen zum Protein ausgebildet werden können. Allerdings muss dafür eine neue Synthese erarbeitet werden, da die Nukleophilie des Stickstoffs für eine Substitution des Bromatoms nicht ausreichend ist.

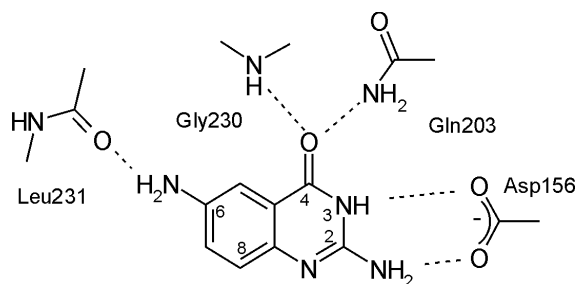
Ein entscheidender Nachteil aller drei Stoffklassen soll allerdings nicht verschwiegen werden. Wegen der nur sehr schlechten Wasserlöslichkeit der Verbindungen in der „Soaking“-Lösung ist es bisher nicht gelungen, eine Struktur der Liganden im Komplex mit *Z. mobilis* TGT zu erhalten.

## 3.5 Chinazolinone als Inhibitoren der TGT

In Zusammenarbeit mit Emmanuel Meyer, Arbeitsgruppe François Diederich, ETH Zürich, wurden Chinazolinone als Inhibitoren der TGT untersucht. Schwerpunkt in der Kooperation war die Messung der  $K_i$ -Werte dieser Inhibitoren sowie deren röntgenstrukturanalytische Charakterisierung im Komplex mit *Z. mobilis* TGT.

### 3.5.1 2-Amino-3*H*-chinazolin-4-on als Leitstruktur

In Analogie zu preQ<sub>1</sub>, dem natürlichen Substrat der TGT, wurde 2-Amino-3*H*-chinazolin-4-on als Leitstruktur entworfen. Der Grundkörper kann potenziell wie das Substrat Wasserstoffbrücken zu Asp156, Gln203 und Gly230 eingehen sowie  $\pi$ -Wechselwirkungen zu Met260 und Tyr106 ausbilden (Abb. 2.7 und 3.26) [Meyer et al., 2002].



**Abb. 3.26** Ausschnitt der Bindetasche der TGT mit dem modellierten Bindungsmodus von **51**. Met260 (nicht gezeigt) befindet sich in der dargestellten Ansicht hinter dem Liganden und Tyr106 (nicht gezeigt) vor ihm.

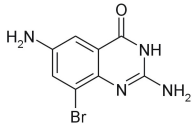
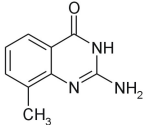
Der Einfluss einer Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Leu231, die preQ<sub>1</sub> ebenfalls eingeht, wurde mit den Verbindungen **51** und **52** (Tabelle 3.13) untersucht.

Verbindung **51** entspricht dem in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Pharmakophor-Modell für TGT-Inhibitoren. Überraschenderweise sind bei einem virtuellen Screening mit diesem Modell keine 2-Amino-3*H*-chinazolin-4-one gefunden worden (Kapitel 3.3.2). Der Grund dafür ist, dass dieser einfach aufgebaute Grundkörper in keiner der verwendeten Datenbanken (Kapitel 5.4.3) abgelegt ist.

Zur Verifizierung des vermuteten Bindungsmodus wurden Kristallstrukturanalysen der Liganden im Komplex mit TGT durchgeführt.



Tab. 3.13 2-Amino-3*H*-Chinazolin-4-one als Leitstruktur-Kandidaten.

Nr.	Name	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
51	2,6-Diamino-8-bromo-3 <i>H</i> -chinazolin-4-on		$9,1 \pm 1,0$
52	2-Amino-8-methyl-3 <i>H</i> -chinazolin-4-on		125

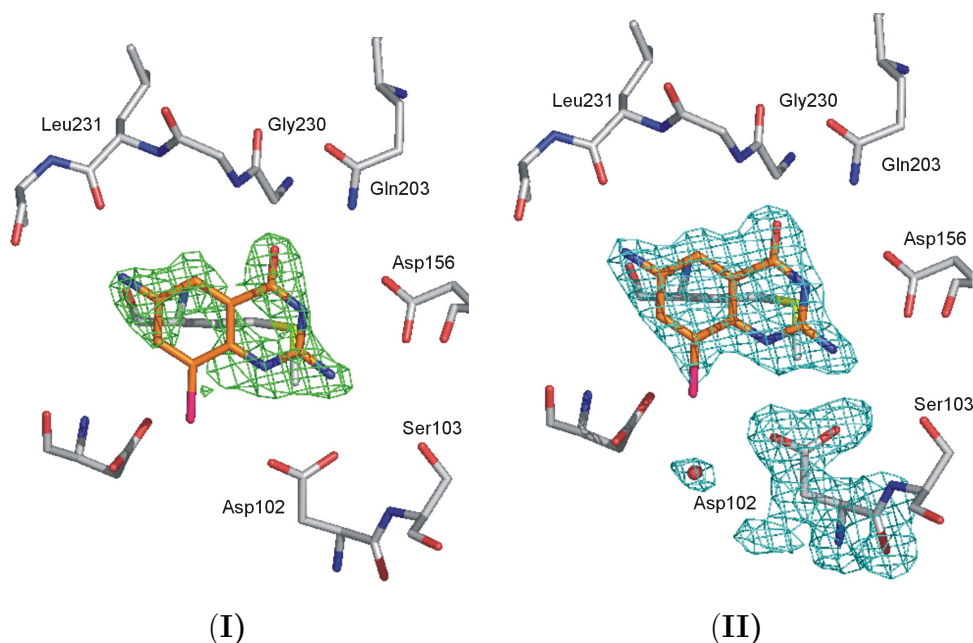
### Kristallstruktur von TGT-51

Ligand **51** konnte erfolgreich in einen Kristall eindiffundiert werden. Die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1,9 Å ist in Abb. 3.27 gezeigt.

Teile des Liganden sind sehr gut in der |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) zu sehen. Allerdings ist in dem erwarteten Bindungsmodus keine Elektronendichte für das elektronenreiche Bromatom zu erkennen. Dieses Faktum bleibt auch nach der anschließenden Verfeinerung bestehen. Elektronendichte für ein Wassermolekül ist in 1,9 Å Abstand von der vermuteten Position des Bromatoms aufzufinden. Diese sehr überraschende Beobachtung kann auf zwei Wegen interpretiert werden. Entweder lag von der Synthese her eine Verunreinigung mit der nicht bromierten Verbindung vor, die im Kristall populierte wurde, oder der Ligand nimmt mehrere Bindungsmoden ein. Im letzteren Fall wäre die Elektronendichte des Bromatoms über mehrere Positionen verteilt und könnte so selbst als Starkstreuer nicht mehr erkannt werden.

Die Seitenkette des Asp102 nimmt zwei unterschiedliche definierte Konformationen ein. In der einen Konformation ist sie zum Liganden hinorientiert. Die terminale Carboxylatgruppe geht dann eine gegabelte Wasserstoffbrücke zur 2-Aminogruppe und zum N1 des Inhibitors ein (unter der Annahme, dass dieser protoniert ist). In der anderen Konformation ist sie vom Liganden weggedreht. Diese Konformation von Asp102 war bisher in allen bekannten Ligand-TGT-Komplexen zu beobachten.

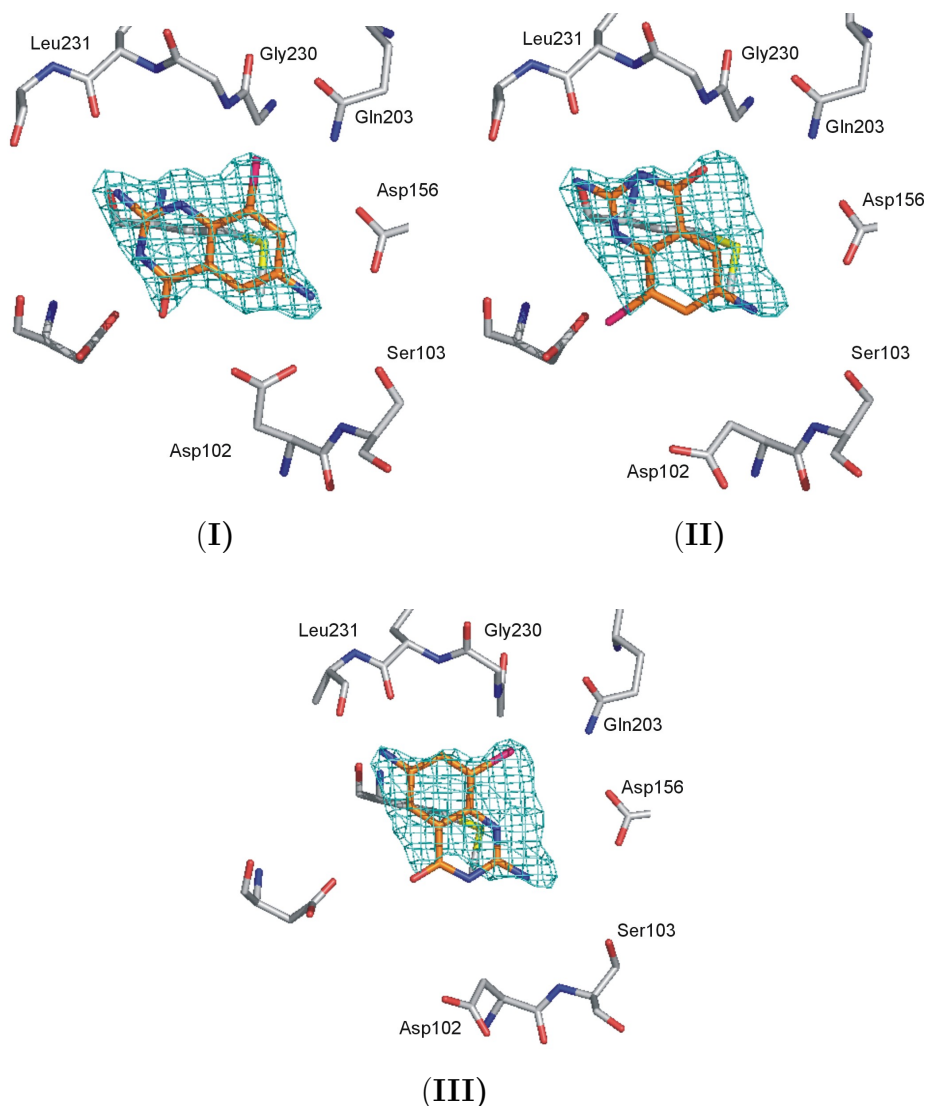
Betrachtet man rein die Form des Liganden ohne Berücksichtigung der Atomtypen und der Wasserstoffatome, so ist sein Gerüst inversionssymmetrisch. Das Symmetriezentrum liegt in der Mitte der C4a-C8a-Bindung. Berücksichtigt man nur die Form der Elektronendichte, kann deshalb auch ein Bindungsmodus postuliert werden, in dem



**Abb. 3.27** Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **51** bei einer Auflösung von 1,93 Å. Die  $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte (grün, konturiert auf  $2,5\sigma$ ) ist zerrissen. Für die Aminopyrimidinon-Teilstruktur sowie die aromatische Aminogruppe ist die Elektronendichte gut definiert. Für das Bromatom ist keine Dichte zu sehen. (II) Der Inhibitor ist bis auf das Bromatom (Populationsparameter für Brom wurden während der Verfeinerung auf 0 gesetzt) eindeutig in der  $2|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte des verfeinerten Strukturmodells (grünblau, konturiert auf  $1,0\sigma$ ) zu erkennen. Für die Seitenkette von Asp102 ist Elektronendichte für zwei Konformationen vorhanden. In der einen, besser definierten, Konformation ist die Seitenkette zum Ligand hinorientiert, in der anderen ist sie von ihm weg gedreht.

das Bromatom zu Gly230 und Gln203 und die Aminogruppe der Aminopyrimidinon-Teilstruktur zu Leu231 zeigen müssten (Abb. 3.28.I). Des Weiteren könnte die Form der Elektronendichte auch prinzipiell zu einem Bindungsmodus passen, in dem der Ligand so gedreht ist, dass seine Carbonylgruppe weiterhin zu Gly230 und Gln203 orientiert ist, aber die 6-Aminogruppe zu Asp156 steht (Abb. 3.28.II). Aus sterischen Gründen muss in diesem Bindungsmodus Asp102 vom Ligand wegorientiert sein. Der Abstand vom C7-Atom des Liganden zum Sauerstoff der Carboxylatgruppe des Aspartats wäre sonst mit nur 2,1 Å unerlaubt kurz. Aus Symmetriegründen ist auch der in Abbildung 3.28.III gezeigte Bindungsmodus mit dem Bromatom zu Gly230 und Gln203 und der aromatischen Aminogruppe zu Leu231 vorstellbar.

In den vier denkbaren Bindungsmoden liegt das Bromatom jeweils an verschiedenen Aufenthaltsorten. Dies wäre zumindest eine Erklärung dafür, dass in der beobachteten Elektronendichte keine hervorgehobene Position für einen Starkstreuer zu erkennen ist.

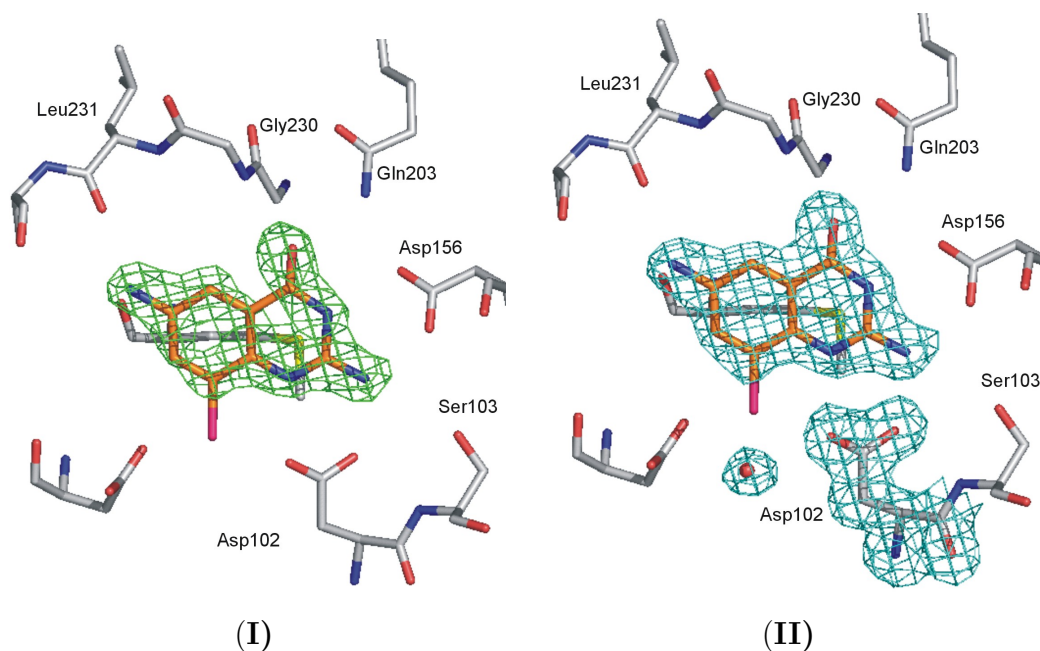


**Abb. 3.28** Denkbare Bindungsmoden von **51** im Komplex mit *Z. mobilis* TGT. Auf Grund der Inversionssymmetrie des Liganden sind von der Form der Elektronendichte her verschiedene Bindungsmoden möglich.

Es muss aber betont werden, dass diese Interpretation davon ausgeht, dass tatsächlich das Bromderivat in der Enzymbindetasche vorliegt und dass nur auf die Einpassung der Geometrie des Ligandengerüsts geachtet wurde. In Hinblick auf die intermolekularen Wechselwirkungen, z. B. in Form der ausgebildeten Wasserstoffbrücken erscheint aber nur der Bindungsmodus aus Abb. 3.27 plausibel. Allerdings erklärt dies nicht die fehlende Elektronendichte für ein Bromatom.

In Kristallstrukturen von Chinazolin-4-onen im Komplex mit TGT, die bei pH 5,5 kristallisiert wurden, wird für die Seitenkette von Asp102 nur die zum Ligand hinorientierte Konformation beobachtet (Kapitel 3.5.4). Diese Konformation ist aus sterischen

Gründen (zu kurzer Abstand zwischen dem Bromatom und der Carboxylatgruppe) mit den Bindungsmoden, wie sie in Abb. 3.28.II und III (kristallisiert bei pH 8,5) gezeigt sind, unvereinbar. Es ist deshalb zu erwarten, dass von **51** bei pH 5,5 nur die Bindungsmoden, die in Abb. 3.27.II und 3.28.I gezeigt sind, eingenommen werden können. Die Struktur von **51** im Komplex mit TGT, kristallisiert bei pH 5,5, mit einer Auflösung von 1,8 Å ist in Abb. 3.29 dargestellt.



**Abb. 3.29** Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **51** bei einer Auflösung von 1,8 Å, kristallisiert bei pH 5,5. (I) Die  $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte (grün, konturiert auf  $2,5\sigma$ ) gibt, mit Ausnahme des Bromatoms, sehr gut die Form des Liganden wieder. Das lässt auf eine hohe Population des Liganden in der Bindetasche schließen. (II) Der Inhibitor ist bis auf das Bromatom (das Bromatom wurde in die Verfeinerung nicht einbezogen) eindeutig in der  $2|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte des verfeinerten Strukturmodells, konturiert auf  $1,0\sigma$ , zu erkennen. Die Seitenkette von Asp102 nimmt nur die zum Ligand hin orientierte Konformation ein.

Wie erwartet, nimmt Asp102, wie auch bei den anderen Komplexstrukturen bei pH 5,5, nur die zum Ligand hinorientierte Konformation ein. Aber auch in dieser Struktur ist keine Elektronendichte für das Bromatom vorhanden. Aus sterischen Gründen (s. o.) ist nur noch ein alternativer Bindungsmodus denkbar (Punktspiegelung des Liganden am Inversionszentrum bei unveränderter räumlicher Orientierung). Aber auch bei diesem Bindungsmodus würde sich ein Atom (Carbonylsauerstoff) an der Position befinden, wo das Bromatom liegen sollte. Deshalb müsste zumindest Elektronendichte in vergleichbarer Größenordnung wie für die anderen Ligandatome vorhanden sein. Dies ist aber nicht der Fall. Es konnte aber am Synchrotron mit einem Kristall, in den **51**

eindiffundiert wurde, die spezifische Absorption für Brom vermessen werden. Danach ist Brom in diesem Kristall vorhanden. Allerdings ist zu bemerken, dass eine solche Röntgenabsorptionsbestimmung extrem empfindlich ist und vermutlich schon auf Spuren von Brom anspricht [Hendrickson & Ogata, 1997]. Nach Auskunft von Emmanuel Meyer sind in den NMR- und Massen-Spektren keine Hinweise auf eine Verunreinigung von **51** zu entdecken. Da einerseits nach der Synthese ausschließlich die bromhaltige Verbindung entstehen sollte, andererseits aber keine Elektronendichte für diesen Starkstreuer zu finden ist, kann nur spekuliert werden, dass sie doch mit der bromfreien Verbindung verunreinigt war. Der Gehalt der Verunreinigung lag vermutlich unter der spektroskopischen Nachweisgrenze. Sie ist entweder deutlich affiner als **51** und / oder besser in der verwendeten „Soaking“-Lösung löslich.

Auch wenn vermutlich das bromfreie Derivat als Verunreinigung von **51** in einen Kristall eindiffundiert wurde, bestätigt die Kristallstrukturanalyse, dass der angenommene Bindungsmodus (Abb. 3.26) auch tatsächlich so eingenommen wird.

### Eignung der Chinazolin-4-one als neue Leitstruktur

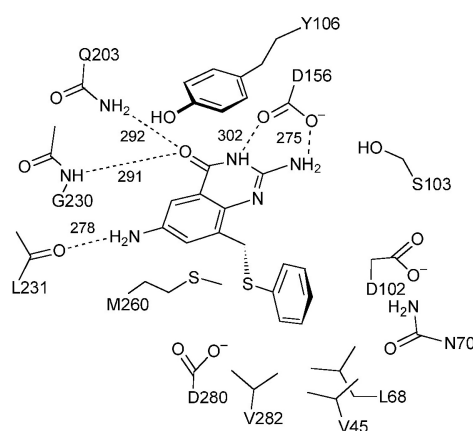
Der  $K_i$ -Wert von **51** liegt mit  $9,1 \mu\text{M}$  im vergleichbaren Bereich wie der von **4** ( $8,3 \mu\text{M}$ , Tab. 2.2 auf Seite 25). Diese Verbindung wurde in einem virtuellen Screening gefunden und diente anschließend als Leitstruktur zur weiteren Optimierung [Grädler et al., 2001].

Von Verbindung **52** konnte leider keine Kristallstruktur im Komplex mit *Z. mobilis* TGT erhalten werden. Es wird davon ausgegangen, dass sie denselben Bindungsmodus wie **51** einnimmt. Die beiden Inhibitoren unterscheiden sich vor allem durch das Fehlen eines Wasserstoffbrücken-Donors als Partner für Leu231. Der  $K_i$ -Wert für **52** ist mit  $125 \mu\text{M}$  um ca. Faktor 13 größer als der von **51**. Das unterstreicht deutlich, dass die Wasserstoffbrücke zu Leu231 einen großen Beitrag zur Affinität leistet. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Überlegungen von Grädler et al. [2001]. Dort wurde der Affinitätsverlust der substituierten Leitstruktur auf die Aufweitung der Wasserstoffbrücke zu Leu231 zurückgeführt.

Mit einem  $K_i$ -Wert im unteren mikromolaren Bereich und einem durch Kristallstrukturanalyse charakterisierten Bindungsmodus erscheint das Molekülgerüst der Diaminochinazolinone als guter Ausgangspunkt für eine weitere Optimierung.

### 3.5.2 Optimierung der Leitstruktur durch Ausfüllen einer lipophilen Tasche

Grädler et al. [2001] verfolgten zur Optimierung ihrer Leitstruktur die Strategie, Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und den polaren Resten von Asp102, Asp280 und Asn70 auszubilden. Bei der Optimierung von **51** hingegen wurde versucht, eine lipophile Tasche, die durch Leu68, Val45 und Val282 gebildet wird, auszufüllen [Meyer et al., 2002] (Abb. 3.30). Dazu wurde eine kleine Serie Inhibitoren mit unterschiedlichen lipophilen Resten in der 8-Position synthetisiert (Tabelle 3.14).

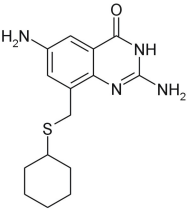
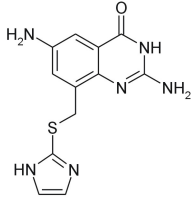
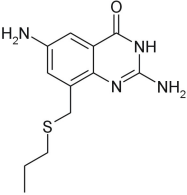
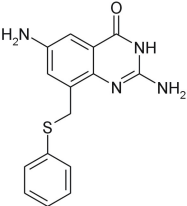
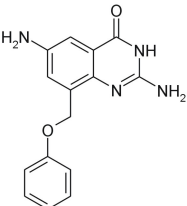
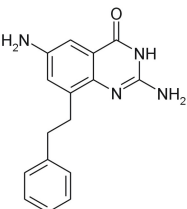


**Abb. 3.30 Bindetasche der TGT mit dem modellierten Bindungsmodus von 56.** Zur Optimierung der Leitstruktur sollte die lipophile Tasche, die durch Leu68, Val45 und Val282 gebildet wird, ausgefüllt werden. Die Längen der Wasserstoffbrücken sind in pm angegeben.

Alle Verbindungen erweisen sich als im unteren mikromolaren Bereich aktiv, Verbindung **56** bindet sogar submikromolar ( $K_i = 100$  nM). Sie stellt den Inhibitor mit der derzeit höchsten Bindungsaffinität dar.

Die Verbindungen **54** und **55** konnten erfolgreich in einen Kristall eindiffundiert werden. Die Kristallstruktur von TGT·**54** wurde mit einer Auflösung von 1,7 Å, die von TGT·**55** mit 1,8 Å bestimmt (Abb. 3.31). Die 2|Fo|-|Fc|-Elektronendichten beider Strukturen (konturiert auf 1,0  $\sigma$ ) zeigen, dass der 2,6-Diamino-3*H*-chinazolin-4-on-Grundkörper den zunächst postulierten und kristallographisch charakterisierten Bindungsmodus mit Wasserstoffbrücken zu Asp156, Leu231, Gly230 und Gln203 tatsächlich einnimmt (Kapitel 3.5.1). Der Verlauf der Elektronendichte für die Seitenketten ist jeweils zerrissen. Deutlich erkennbare Elektronendichte ist lediglich für das Schwefelatom vorhanden. Dieses befindet sich in der gezeigten Ansicht hinter der Ebene durch die Atome des

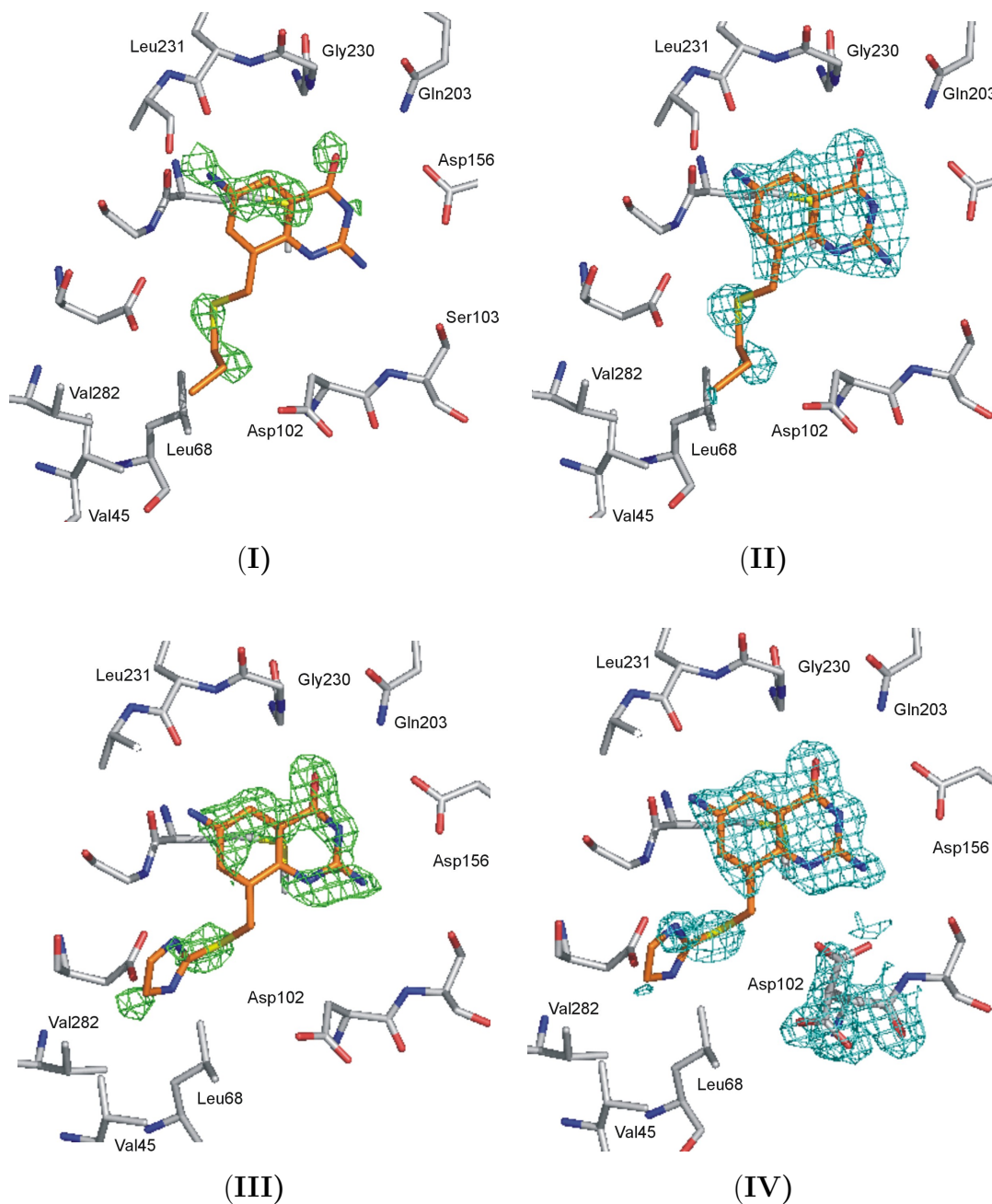
Tab. 3.14 Chinazolin-4-one mit unterschiedlichen lipophilen Resten in der 8-Position.

Nr.	Name	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
53	2,6-Diamino-8-cyclohexylsulfanylmethyl-3 <i>H</i> -chinazolin-4-on		$5,4 \pm 0,6$
54	2,6-Diamino-8-(1 <i>H</i> -imidazol-2-ylsulfanylmethyl)-3 <i>H</i> -chinazolin-4-on		$1,4 \pm 0,6$
55	2,6-Diamino-8-propylsulfanylmethyl-3 <i>H</i> -chinazolin-4-on		$7,7 \pm 1,6$
56	2,6-Diamino-8-phenylsulfanylmethyl-3 <i>H</i> -chinazolin-4-on		$0,1 \pm 0,02$
57	2,6-Diamino-8-phenoxyethyl-3 <i>H</i> -chinazolin-4-on		$5,6 \pm 0,4$
58	2,6-Diamino-8-phenethyl-3 <i>H</i> -chinazolin-4-on		$3,6 \pm 1,2$

Grundkörpers, also auf der Seite zu Met260 hin.

Die weiteren Verbindungen dieser Serie ließen sich leider nicht in Kristalle eindiffundieren.





**Abb. 3.31** Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit 55 bei einer Auflösung von 1,8 Å (I, II) und im Komplex mit 54 bei einer Auflösung von 1,7 Å (III, IV), kristallisiert bei pH 8,5. (I, III) Die  $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte (grün, konturiert auf 2,0 bzw. 2,5  $\sigma$ ) ist stark zerrissen. Dies lässt auf eine reduzierte Population der Liganden in der Bindetasche schließen. Dichte für das Schwefelatom befindet sich in der verwendeten Ansicht jeweils hinter der Ebene durch die Atome des Grundkörpers. (II, IV) Der 2,6-Diamino-3*H*-chinazolin-4-on-Grundkörper ist eindeutig in der  $2|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte (grünblau, konturiert auf 1,0  $\sigma$ ) der verfeinerten Strukturmodelle zu lokalisieren. Für die Propylsulfanylmethyl- bzw. Imidazolylsulfanylmethyl-Seitenkette ist nur Dichte für das Schwefelatom erkennen. Das lässt darauf schließen, dass die Seitenketten entweder multiple Bindungsmoden einnehmen oder über mehrere Anordnungen verteilt vorliegen.



Die  $|\text{Fo}|$ - $|\text{Fc}|$ -Elektronendichten der beiden Liganden sind zerrissen. Außerdem sind die B-Faktoren der Ligandatome fast doppelt so hoch wie die der umgebenden Aminosäuren (Ligandatome:  $47 \text{ \AA}^2$  (TGT·**54**) bzw.  $59 \text{ \AA}^2$  (TGT·**55**); Aminosäurereste: jeweils ca.  $20 \text{ \AA}^2$  (Tab. A.3 auf Seite 176 und A.2 auf Seite 175)). Daraus kann geschlossen werden, dass der Bindungsmodus nur unvollständig populiert ist. Ein Grund hierfür kann in der schlechten Löslichkeit der Verbindungen in der „Soaking“-Lösung liegen (Tabelle 3.15). Die Löslichkeit der Liganden dieser Serie beträgt maximal  $714 \mu\text{M}$ . Von drei der vier am besten löslichen Verbindungen konnte eine Röntgenstruktur erhalten werden. Berücksichtigt man die relativ großen Messfehler, so ist es durchaus möglich, dass die tatsächliche Löslichkeit von der nicht eindiffundierten Verbindung **57** (Rang 3) etwas unterhalb der von **54** (Rang 4) liegt. Die Löslichkeiten der anderen nicht eindiffundierbaren Verbindungen sind wesentlich geringer, z.T. liegen sie unterhalb der Messgrenze.

**Tab. 3.15 Löslichkeiten verschiedener Chinazolin-4-one in der „Soaking“-Lösung.** Strukturformeln siehe Tab. 3.13 auf Seite 83, Tab. 3.14 auf Seite 89 und Tab. 3.17 auf Seite 104.

Nr.	Löslichkeit [ $\mu\text{M}$ ]	„Soaking“ erfolgreich
<b>55</b>	$714 \pm 11$	✓
<b>51</b>	$437 \pm 21$	✓
<b>57</b>	$384 \pm 71$	-
<b>54</b>	$358 \pm 11$	✓
<b>53</b>	152	-
<b>58</b>	$98 \pm 1$	-
<b>60</b>	40	-
<b>56</b>	39	-
<b>59</b>	nicht messbar	-
<b>61</b>	nicht messbar	-
<b>62</b>	nicht messbar	-

Ligand **54** ist unter den erfolgreich eindiffundierten Verbindung der mit der niedrigsten Löslichkeit dieser Serie ( $358 \mu\text{M}$ ). Allerdings besitzt er die höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu **51** und **55** (wobei für **51** nicht wirklich geklärt ist, ob das Bromderivat in den Kristallen populiert wurde). Um die Abhängigkeit des erfolgreichen „Soakings“ von der Löslichkeit der Liganden näher zu untersuchen, wurde **54** bei verschiedenen Konzentrationen in TGT-Kristalle eindiffundiert. Nur bei Verwendung der Sättigungskon-

zentration konnte eine interpretierbare Elektronendichte für den Liganden beobachtet werden.

In Fragment basierenden Screening-Ansätzen, deren erfolgreiche Bindung an ein Protein durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden konnte, werden üblicherweise Ligandkonzentrationen von mehr als 10 mM eingesetzt [Blundell et al., 2002; Lesuisse et al., 2002]. Diese hohen Konzentrationen sind einerseits wegen der erwarteten niedrigen Bindungsenergie der Fragmente und andererseits wegen der hohen eingesetzten Proteinkonzentration erforderlich. Das Kristallwachstum der TGT-Kristalle erfolgt aus einer Lösung, die ca. 7,5 mg/ml Protein enthält (Kapitel 5.3.1). Das entspricht einer Konzentration von ca. 175  $\mu\text{mol/ml}$ . Zwar wird diese Lösung während der Kristallisation verdünnt, aber die Protein-Konzentration im Kristall selbst ist deutlich höher. So hohe Konzentrationen werden von den Liganden, die nicht in Kristalle eindiffundieren konnten, nicht erreicht (Tab. 3.15).

Zusammengenommen deutet alles darauf hin, dass die Löslichkeiten der eindiffundierbaren Liganden bereits im unteren Grenzbereich für ein erfolgreiches „Soaking“ liegen. Die der nicht eindiffundierbaren Liganden liegt deutlich darunter. Für ein erfolgreiches „Soaking“ sind demnach entweder löslichere Liganden erforderlich oder die „Soaking“-Lösung muss so zusammengesetzt werden, dass die Löslichkeit der Liganden deutlich erhöht wird, ohne dass dabei die Kristalle zerstört werden.

### 3.5.3 Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT bei pH 5,5

Die 2-Amino-3*H*-pyrimidin-4-on-Teilstruktur der Chinazolin-4-one der in diesem Abschnitt beschriebenen Liganden hat basische Eigenschaften [Levene et al., 1926]. Deshalb sollte die Löslichkeit dieser Verbindungen im sauren pH-Bereich höher als im basischen sein. Die bisher benutzte „Soaking“-Lösung hat einen pH-Wert von 8,5 [Grädler et al., 2001]. Um die Löslichkeit der Liganden zu erhöhen, wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit „Soaking“-Bedingungen bei pH 5,5 etabliert (Kapitel 5.3.1). Noch niedrigere pH-Bedingungen waren nicht anwendbar, da dann das Protein denaturiert wird und ausfällt.

Die Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT, kristallisiert bei pH 8,5, unterscheidet sich von der bei pH 5,5. Die Änderungen werden im folgenden beschrieben.

### Änderungen der Proteinstruktur außerhalb der Bindetasche

Die Kristallstruktur der TGT bei pH 8,5 besitzt zwei Bereiche (Aminosäuren 126 - 133 bzw. 286 - 290) mit einem hohen B-Faktor ( $> 45 \text{ \AA}^2$  bzw.  $> 70 \text{ \AA}^2$ ;  $\sigma$ :  $20,7 \text{ \AA}^2$ ) [Romier et al., 1996b]. Beide Bereiche enthalten relativ viele geladene Aminosäuren (Lys125, His127, Asp129, Arg132 und His133 bzw. Arg286 und Arg289). Interessanterweise treten genau dort zwei gegenläufige Änderungen bei der Kristallisation bei pH 5,5 auf (Abb. 3.32.I - II). Im Bereich der  $\beta$ -Faltblätter 7 - 9 (Abb. 2.6) nimmt die Unordnung zu. Der  $\beta$ 9-Strang ist im Sauren komplett ungeordnet (Abb. 3.32.II - IV). Der andere Bereich, ein Teil der  $\alpha$ -Helix 12, ist unter diesen Bedingungen dagegen wesentlich besser definiert. Die Helix bildet eine zusätzliche Windung aus (Abb. 3.32.I und V - VI). Beide Regionen sind nicht an der Bindung von preQ<sub>1</sub> beteiligt. Bei dem Faltblatt-Bereich handelt es sich um einen Einschub in die klassische  $(\beta/\alpha)_8$ -Fass-Struktur; Helix  $\alpha$ 12 hingegen verbindet die Fass-Struktur mit der Zink bindenden Domäne und ist wahrscheinlich an der tRNA-Bindung beteiligt.

### Änderungen der Proteinstruktur in der Bindetasche

In der Bindetasche der apo-Struktur bei pH 5,5 tritt eine interessante Änderung im Vergleich zu der bei pH 8,5 auf. Die Carbonylgruppe von Leu231 wird aus der Bindetasche gedreht, während die NH-Gruppe von Ala232 nun in die Bindetasche zeigt und eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül eingeht (Abb. 3.33.I). Dieselbe Konformation wurde zuvor schon in der Struktur der TGT im Komplex mit **18**, kristallisiert bei pH 8,5, beobachtet (Abb. 3.6). Die Carbonylgruppe von Leu231 ist nun in Wasserstoffbrücken-Entfernung (2,4 bzw. 2,9 Å) zur terminalen Carboxylatgruppe von Glu235. Falls die Carboxylatgruppe deprotoniert wäre, würde es sich um einen energetisch ungünstigen Abstand zwischen zwei Akzeptorgruppen handeln. Glutaminsäure hat in wässriger Lösung einen  $pK_a$ -Wert von 4,1 [Dawson et al., 1969]. Es ist bekannt, dass es in Proteinen zu einer  $pK_a$ -Wert-Verschiebung von mehreren Größenordnungen kommen kann [Antosiewicz et al., 1996]. Durch die sauren Kristallisationsbedingungen (pH 5,5) wird eine Protonierung der Carboxylatgruppe noch zusätzlich begünstigt. Aus diesem Grund kann spekuliert werden, dass unter diesen Bedingungen die Carboxylatgruppe von Glu235 protoniert vorliegt. Dann würde sie eine starke Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Leu231 ausbilden.

Die Kristallstrukturen der archaebakteriellen *P. horikoshii* TGT im Komplex mit Guanin, preQ<sub>0</sub> und als apo-Form wurden bei einer Auflösung von 2,3 - 2,5 Å gelöst ([Ishitani

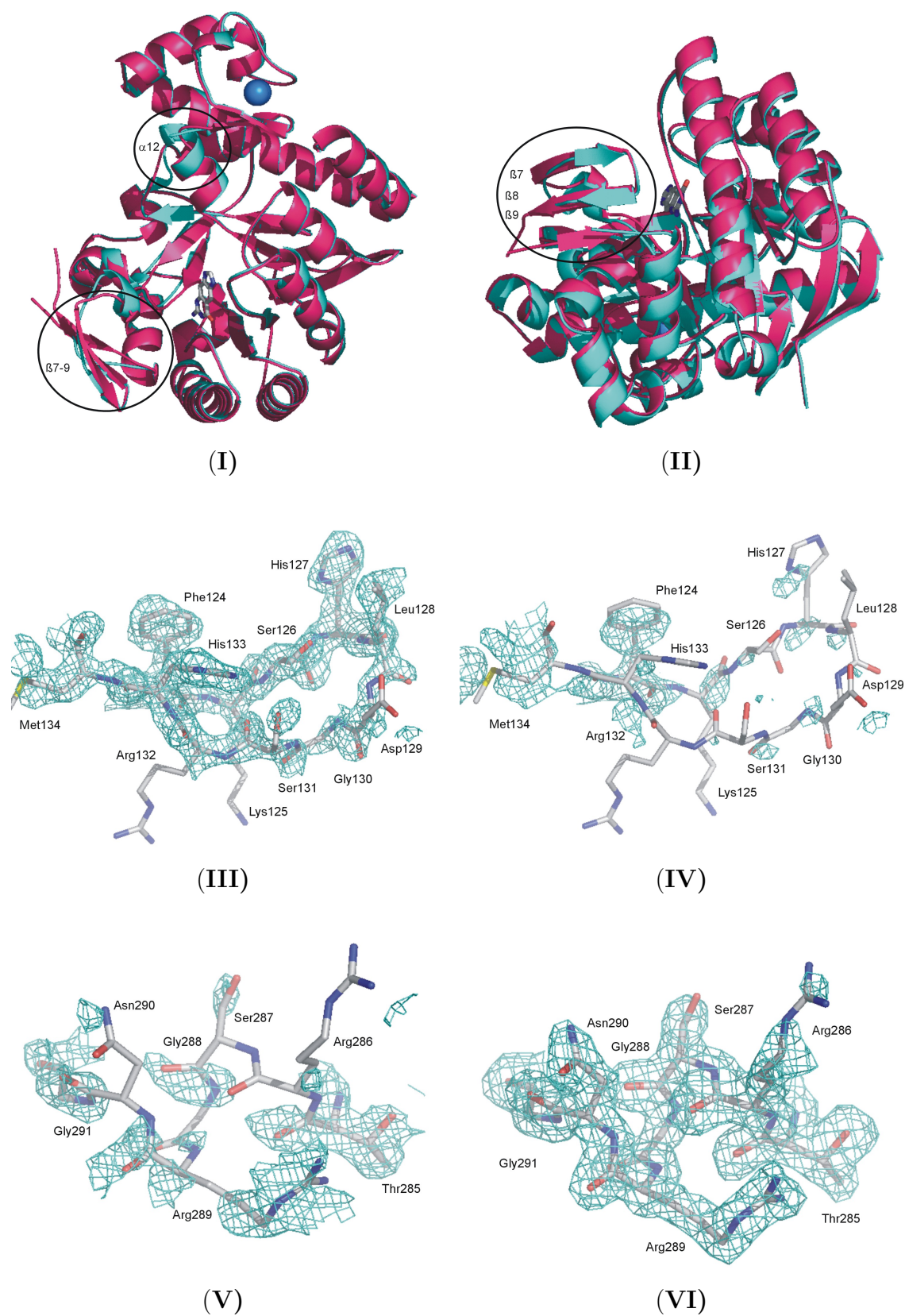
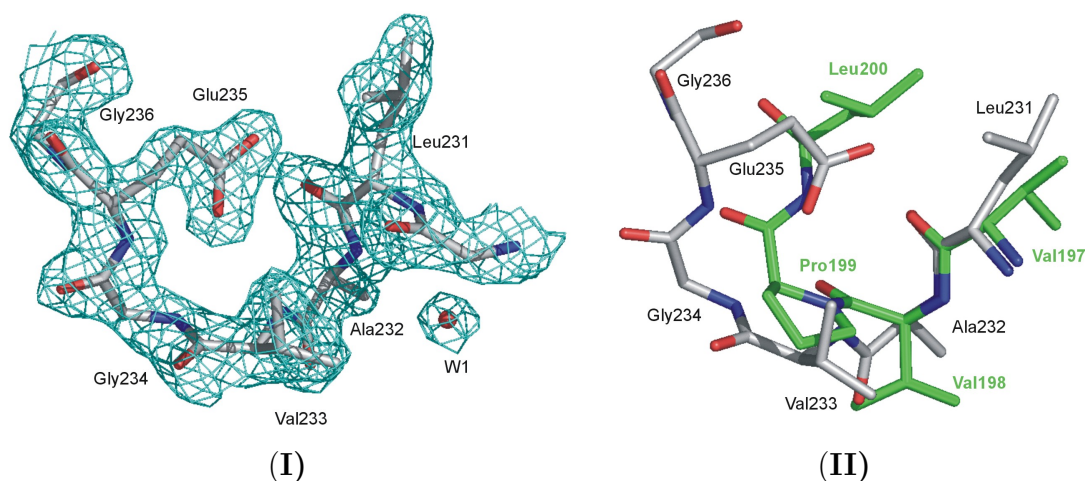


Abb. 3.32 Vergleich der bei unterschiedlichen pH-Werten kristallisierten Strukturen der *Z. mobilis* TGT. (Fortsetzung der Legende siehe nächste Seite.)

**Abb. 3.32** (Fortsetzung der Legende) (I, II) Überlagerung der Faltungsmuster der Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT bei pH 5,5 (grünblau) und pH 8,5 (violett). Markiert sind die Bereiche, die in der Kristallstruktur der *Z. mobilis*, kristallisiert bei pH 8,5 einen hohen B-Faktor besitzen. (I) Die Helix  $\alpha 12$  bildet bei pH 5,5 eine zusätzliche Windung aus. (II) Die Unordnung im Bereich der  $\beta$ -Faltblätter 7 - 9 nimmt bei pH 5,5 zu. Das Faltblatt  $\beta 9$  ist komplett ungeordnet. (III - VI) Ausschnitt der  $2|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte, konturiert auf  $1,0 \sigma$ , von Bereichen der Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT, die bei der Kristallisation bei pH 8,5 einen hohen B-Faktor besitzen. (III, IV) Elektronendichte für die Aminosäuren 124 - 134 (Teil von  $\beta 9$ ). (III) Kristallisiert bei pH 8,5. Die Elektronendichte für das Protein-Rückgrat und große Teile der Seitenketten in diesem Bereich ist gut definiert. (IV) Kristallisiert bei pH 5,5. Für die Aminosäuren 125 bis 133 ist praktisch keine Elektronendichte zu erkennen. (V, VI) Elektronendichte für die Aminosäuren 285 - 291 (letzte Windung von  $\alpha 12$ ). (V) Kristallisiert bei pH 8,5. Die Elektronendichte ist zerrissen. Die Aminosäuren 286 bis 290 sind ungeordnet. (VI) Kristallisiert bei pH 5,5. Für die Aminosäuren 286 bis 290 ist durchgehend gut definierte Elektronendichte zu erkennen.

et al., 2002], Kapitel 2.7). Alle diese Strukturen zeigen im Vergleich zur apo-Struktur der *Z. mobilis* TGT, kristallisiert bei pH 8,5, eine gedrehte Rückgrat-Konformation der Peptidbindung zwischen Val197 und Val198 (Leu231 und Ala232 in *Z. mobilis* TGT). Sie entspricht somit genau der Konformation, die in der apo-Struktur der *Z. mobilis* TGT, kristallisiert bei pH 5,5, zu sehen ist. Überlagert man diese beiden Strukturen, so befindet sich an der Position, in der in der *Z. mobilis* TGT-Struktur ein  $O\delta$  von Glu235 zu liegen kommt, die NH-Gruppe von Leu200 der *P. horikoshii* TGT (Abb. 3.33.II).



**Abb. 3.33** pH-induziertes Umklappen der Amidbindung von Leu231 zu Ala232. (I)  $2|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte, konturiert auf  $1,0 \sigma$ , bei einer Auflösung von  $1,9 \text{ \AA}$ . (II) Überlagerung der Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT (grau) mit der der *P. horikoshii* TGT (grün).

Diese NH-Gruppe geht eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Val197 ein. Genau an derselben Stelle würde sich eine Wasserstoffbrücke in der *Z. mobilis* TGT-Struktur befinden, wenn Glu235 protoniert vorläge.

Archaeobakterielle *P. horikoshii* TGT unterscheidet sich von prokaryontischer *Z. mobilis* TGT in der Substratspezifität (Tab. 2.1 auf Seite 15). Archaeobakterielle TGT akzeptiert ausschließlich preQ<sub>0</sub> mit einer endständigen Nitrilgruppe (also einer Akzeptorgruppe), während die prokaryontische TGT zudem auch preQ<sub>1</sub> mit einer endständigen NH<sub>2</sub>-Gruppe (also einer Donorgruppe) akzeptiert (Abb. 2.4 auf Seite 14). Diese für die molekulare Erkennung zweier unterschiedlicher Molekülgruppen erforderliche Multifunktionalität könnte der Grund dafür sein, dass das Protein-Rückgrat im Bereich von Leu231 zu Glu235 in der *Z. mobilis* TGT im Gegensatz zur *P. horikoshii* TGT flexibel ist. Statt dem beweglichen Gly234 enthält die *P. horikoshii* TGT in dieser Region das starre Pro196. In der *Z. mobilis* TGT kann, je nach Ligand, entweder die Carbonylgruppe von Leu231 als Akzeptor in die Bindetasche gedreht werden oder die NH-Gruppe von Ala232 wird als Donorfunktion exponiert. Zudem kann Glu235 wahrscheinlich protoniert oder deprotoniert vorliegen und dementsprechend als Donor oder Akzeptor die eine oder andere Protein-Rückgrat-Konformation stabilisieren.

Eine Suche in der SWISS-PROT-Datenbank [Bairoch & Apweiler, 2000] nach homologen Proteinen zur *Z. mobilis* TGT und anschließendem Alignment mit FASTA [Pearson & Lipman, 1988] ergab, dass Glu235 in allen eukaryontischen und prokaryontischen TGT-Sequenzen mit Ausnahme der Chlamydien TGT konserviert ist (Abb. 3.34). Die archaeobakteriellen TGTs enthalten dagegen diese Aminosäure nicht. Da auch die eukaryontischen TGTs sowohl preQ<sub>0</sub> als auch preQ<sub>1</sub> als Substrat akzeptieren, ist das ein weiterer Hinweis darauf, dass Glu235 in der Substratspezifität eine wichtige Rolle spielt. Diese Annahme könnte durch die Mutation von Glu235 zu Glutamin überprüft werden. Durch diesen Austausch würde die pH-abhängige Ambivalenz der Carboxylatgruppe von Glu235, nämlich sowohl als Donor als auch als Akzeptor fungieren zu können, blockiert. Die Amidgruppe eines Glutamins würde eine permanente Donor-Eigenschaft in Form der NH<sub>2</sub>-Gruppe aufweisen. Demnach ist es möglich, dass in der Mutante pH-unabhängig die Protein-Rückgrat-Konformation stabilisiert wird, die die NH-Funktion von Ala232 in die Bindetasche exponiert, und damit analog zur *Z. mobilis* apo-Struktur bei pH 5,5 bzw. der *P. horikoshii* TGT vorliegt.



		200	210	220	230	.
Query	100.0%	GIQQGSVFENLRQQSADALAEIGFDGYAVGGGLAVGEGQDEMF				
1 SW: <a href="#">TGT_ZYMMO</a>	100.0%	GIQQGSVFENLRQQSADALAEIGFDGYAVGGGLAVGEGQDEMF				
2 SW: <a href="#">TGT_CAUCR</a>	63.1%	GIQQGSTFENLRRESSERLREIGFDGYAIGGLAVGEGHQAMC				
3 SW: <a href="#">TGT_RICCN</a>	62.5%	GIIQGSVYEEIREQSAKDLVELDFEGYAIGGLAVGEGQEIMF				
4 SW: <a href="#">TGT_RICPR</a>	60.5%	GIIQGSVYKEIREQSVKDLVKDFEGYAIGGLAVGEGQEIMF				
5 SW: <a href="#">TGT_PASMU</a>	56.8%	GIIQGGVYEEIRKVSVEGLVNI GFDGYAVGGGLAVGEPKEDMH				
6 SW: <a href="#">TGT_RHIME</a>	57.0%	GIVQGGDIPRI RERSALALRDLDLKG YAVGGGLAVGEPQEVML				
7 SW: <a href="#">TGT_HAEIN</a>	56.6%	GIIQGGVFEEIRKVSLEGLVNI GFDGYAVGGGLAVGEPKEDMH				
8 SW: <a href="#">TGT_VIBCH</a>	55.7%	GIVQGGVYEDLRDVSVKGLTEIGFDGYAVGGGLAVGEPKEDMH				
9 SW: <a href="#">TGT_SALTI</a>	56.3%	GIIQGSVYEDLRDISVKGLVEIGFDGYAVGGGLAVGEPKADMH				
10 SW: <a href="#">TGT_SALTY</a>	56.3%	GIIQGSVYEDLRDISVKGLVEIGFDGYAVGGGLAVGEPKADMH				
11 SW: <a href="#">TGT_BRUME</a>	55.0%	GIVQGGDIARLRERSAEALKAMD LKGSVGGGLAVGEPQEVML				
12 SW: <a href="#">TGT_ECOLI</a>	55.8%	GIIQGSVYEDLRDISVKGLVDIGFDGYAVGGGLAVGEPKADMH				
13 SW: <a href="#">TGT_SHIFL</a>	55.5%	GIIQGSYIEDLRDISVKGLVDIGFDGYAVGGGLAVGEPKADMH				
14 SW: <a href="#">TGT_YERPE</a>	55.0%	GIIQGGVYEDLRDVSVKGLVDIGFDGYAVGGGLAVGEPKEDMH				
15 SW: <a href="#">TGT_RHILO</a>	55.8%	GIVQGGDNAALRVRSQAQALSAMGLKG YAVGGGLAVGEPQAVML				
16 SW: <a href="#">TGT_PSEAE</a>	53.6%	GIVQGGMHEDLRRLSLDGLQEIGFDGLAIGGLSVGEPKEMI				
17 SW: <a href="#">TGT_NEIMA</a>	51.8%	GIVQGAMYEDLRREESLKGLEELDFPGLAIGGLSVGEPKPEMY				
18 SW: <a href="#">TGT_BACSU</a>	50.4%	GIVQGGYEDLR TQSAKDLISLDFPGYAIGGLSVGEPKDV MN				
19 SW: <a href="#">TGT_NEIMB</a>	51.9%	GIVQGAMYEDLRREESLRGLEQDFPGLAVGGLSVGEPKPEMY				
20 SW: <a href="#">TGT_LISIN</a>	50.3%	GIVQGGAYEDLR AQSADLVSLDFPGYSIGGLSVGEPKDV MN				
21 SW: <a href="#">TGT_STRPY</a>	51.7%	GIVQGAGFEDLR RQSAADLVAMDFPGYSIGGLAVGESHEEMN				
22 SW: <a href="#">TGT_LISMO</a>	50.0%	GIVQGGAYEDLR AQSADLVSLDFPGYSIGGLSVGEPKDV MN				
23 SW: <a href="#">TGT_STAAM</a>	50.3%	GIIQGGYEDLRREQSAKDLVELDFPGYAIGGLSVGEPKPMY				
24 SW: <a href="#">TGT_XYLFA</a>	51.9%	GIIQGGVHPDLRGRSLDGLQAIGFDGYIGGLAVGESESE RN				
25 SW: <a href="#">TGT_BACHD</a>	49.2%	GIIQGGYEDLR RQSAQDITSLDFPGYAIGGVSVGEPKDV MN				
26 SW: <a href="#">TGT_LACLA</a>	49.7%	GIVQGAGFEDLR RQSARDLTSMDFAGYSIGGLAVGESHKEMN				
27 SW: <a href="#">TGT_STRPN</a>	48.8%	GIVQGAGFEDLR RQSAHDLVSMDFSGYSIGGLAVGETHEEMN				
28 SW: <a href="#">TGT_CLOPE</a>	47.2%	GINQGGVYEDIR IEHAKTIREMDLDGYAIGGLAVGETHEEMY				
29 SW: <a href="#">TGT_BUCAI</a>	48.0%	GIIHGGIYPSLRDISLQELIKIDFDGYALGGLAVGEPKIEMY				
30 SW: <a href="#">TGT_DEIRA</a>	47.0%	AIVQGGVHEDLR LKLSLEATLPFATPGFAVGGGLAVGESKEEMY				
31 SW: <a href="#">TGT_THEMA</a>	46.6%	GIVQGGIYPDLRRESALQLTSLIGFDGYAIGGLSIGEERSITL				
32 SW: <a href="#">TGT_CLOAB</a>	45.8%	GINQGGVYDDIR IEHAKTIAKMDLDGYAIGGLAVGETHEEMY				
33 SW: <a href="#">TGT_ANASP</a>	46.7%	GIVQGGVYLDLR AKAANTLTELDLPGYAIGGVSVGEPPEMMA				
34 SW: <a href="#">TGT_AQUAE</a>	46.1%	GIVQGAFWKDLRKKAVEET--LKFdgYSIGGLSVGEPKEIMY				
35 SW: <a href="#">TGT_HELPY</a>	42.9%	AIIQGGTHLKM RSLSV-GLTHEGFDGYAIGGLAVGESADEML				
36 SW: <a href="#">TGT_HELPJ</a>	43.2%	AIIQGGTHLKM RSLSV-GLTHEGFDGYAIGGLAVGESVDEML				
37 SW: <a href="#">TGT_DROME</a>	42.0%	PIVQGGLDVPLRQRCVSALMERQVRGFAVGGLSGGE SKHDFW				
38 SW: <a href="#">TGT_SYNY3</a>	43.2%	GIVQGGTYLDR SQAEQLIALDLPGYAIGGVSVGEPALID				
39 SW: <a href="#">TGT_HUMAN</a>	42.4%	AIIQGGLDADLRATCLEMTKRDPVPGFAIGGLSGGESKSQFW				
40 SW: <a href="#">TGT_CAMJE</a>	41.1%	GIIQGGTDYEE RKRCSLNEMPF DGLAIGGLSVGEENALMY				
41 SW: <a href="#">TGT_MOUSE</a>	41.4%	AIIQGGNLADLR TTTCLKEMTKRDPVPGFAIGGLSGGESKAQFW				
42 SW: <a href="#">TGT_SCHPO</a>	40.5%	CIIQGGLDKRLREICCREMVKRNTPGI AVGGLSGGE EKHAFC				
43 SW: <a href="#">TGT_CAEEL</a>	40.2%	PILQGGNLLEIRKECAKEMAKRAKVGI AIGGLSGGE EKDHFW				
44 SW: <a href="#">TGT_BORBU</a>	36.6%	LITQGNFFKDLRKR SINDILELDSPGIAIGGISVGEPREKYL				
45 SW: <a href="#">TGT_RALSO</a>	52.7%	GIVQGGMFELRDESLAGLQAigFGGYAIGGLSVGEPKEDMI				
46 SW: <a href="#">TGT_CHLPN</a>	35.5%	GVIHGGLDPEQRRIGVRFVEDEPFDGSAIGG-SLGRNLQEMS				
47 SW: <a href="#">Y436_METJA</a>	26.1%	GTVQGSTYLDLRQKS AKEMAKLGFDIYPIGAVVPLMEQYRYR				
48 SW: <a href="#">TGT_ARCFU</a>	40.9%	GVVQGGYEDLR EKSARFMAERDFAGYGIGG-SLGKSKQDML				
49 SW: <a href="#">TGT_CHLMU</a>	35.2%	GVIHGGTFPDQRKLG CQFVEDLPFDGSAIGG-SLGKNL RDIV				
consensus/100%		....ss.....p.....h.....slss.s.....h.				
consensus/90%		uIhQGu...phRt.shth.thsh.GhulGGlusGEst..h.				
consensus/80%		GI lQGuha.cIRp.uhptlhphshsGaulGGLulGESpt.hh				

**Abb. 3.34** Sequenzüberlagerung der homologen TGT-Sequenzen, die in der Swiss-Prot-Datenbank enthalten sind. Alle prokaryontischen und eukaryontischen TGTs mit Ausnahme der Chlamydien TGT enthalten Glu235 (*Z. mobilis* Nummerierung, gelb markiert). Die archaebakteriellen TGTs enthalten diese Aminosäure nicht. (Eingefärbt nach Identität und Eigenschaft.)

### 3.5.4 „Soaking“ von Chinazolin-4-onen bei pH 5,5

Zur Optimierung der Leitstruktur wurden, wie erwähnt, Verbindungen mit unterschiedlichen lipophilen Resten in der 8-Position synthetisiert (Kapitel 3.5.2). Bei pH 8,5, den bisher verwendeten „Soaking“-Bedingungen [Grädler et al., 2001], konnte von zwei der sechs Liganden aus Tab. 3.14 eine Kristallstruktur im Komplex mit *Z. mobilis* TGT erhalten werden. Bei der 2-Amino-3*H*-pyrimidin-4-on-Teilstruktur der Chinazolin-4-one handelt es sich um schwache Basen [Levene et al., 1926]. Deshalb wurden „Soaking“-Bedingungen bei pH 5,5 etabliert, da mit einer erhöhten Löslichkeit der Liganden bei diesen Bedingungen zu rechnen ist (Kapitel 3.5.3). Auf das erfolglose Eindiffundieren innerhalb dieser Serie hatte der pH-Wechsel leider keinen Einfluss. Vermutlich sind die Liganden mit einem  $pK_a$ -Wert von ca. 4,5 nicht ausreichend basisch. Bei einem pH-Wert von 5,5 liegt weiterhin der überwiegende Anteil der Verbindung in der Neutral-Form und damit in der schlechter wasserlöslichen Form vor. Der pH-Wert der „Soaking“-Lösung konnte nicht noch weiter erniedrigt werden, weil dann das Protein zu denaturieren beginnt.

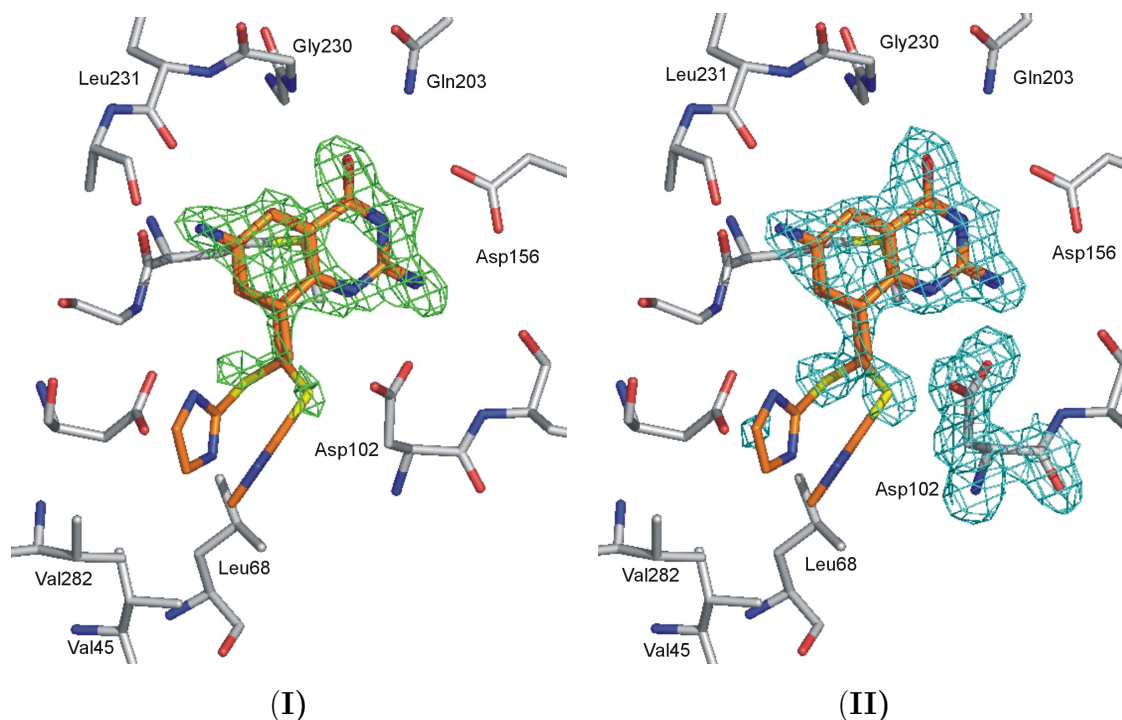
Für zwei weitere Liganden des Chinazolinon-Typs, die eine basische Seitenkette enthalten (Kapitel 3.5.6), sowie für ein Imidazochinazolinon (Kapitel 3.5.7) konnte durch die pH-Änderung der Lösung aber die Löslichkeit so verbessert werden, dass ein erfolgreiches „Soaking“ möglich wurde.

Für Verbindung **54**, mit der auch schon bei pH 8,5 eine Kristallstruktur erhalten worden war, wurde bei pH 5,5 eine wesentlich besser definierte |Fo|-|Fc|-Elektronendichte erhalten (Abb. 3.35.I). Die Struktur wurde mit einer Auflösung von 1,85 Å bestimmt.

Im Gegensatz zum „Soaking“ bei pH 8,5 (Abb. 3.31.III) ist nun eine kontinuierliche |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) für den Grundkörper nachzuweisen. Auch die damit verknüpfte Sulfanylmethyl-Gruppe ist gut definiert. Sie nimmt zwei unterschiedliche Konformationen ein: Das Schwefelatom befindet sich zum einen vor, zum anderen hinter der Ebene durch die Atome des Grundkörpers. Die zusätzliche Konformation wurde beim Design des Liganden (Kapitel 3.5.2) nicht erwartet. Der endständige Imidazolring ist in beiden Konformationen ungeordnet. Er geht offensichtlich keine Wasserstoffbrücke zu Asp102 oder Asp280 ein.

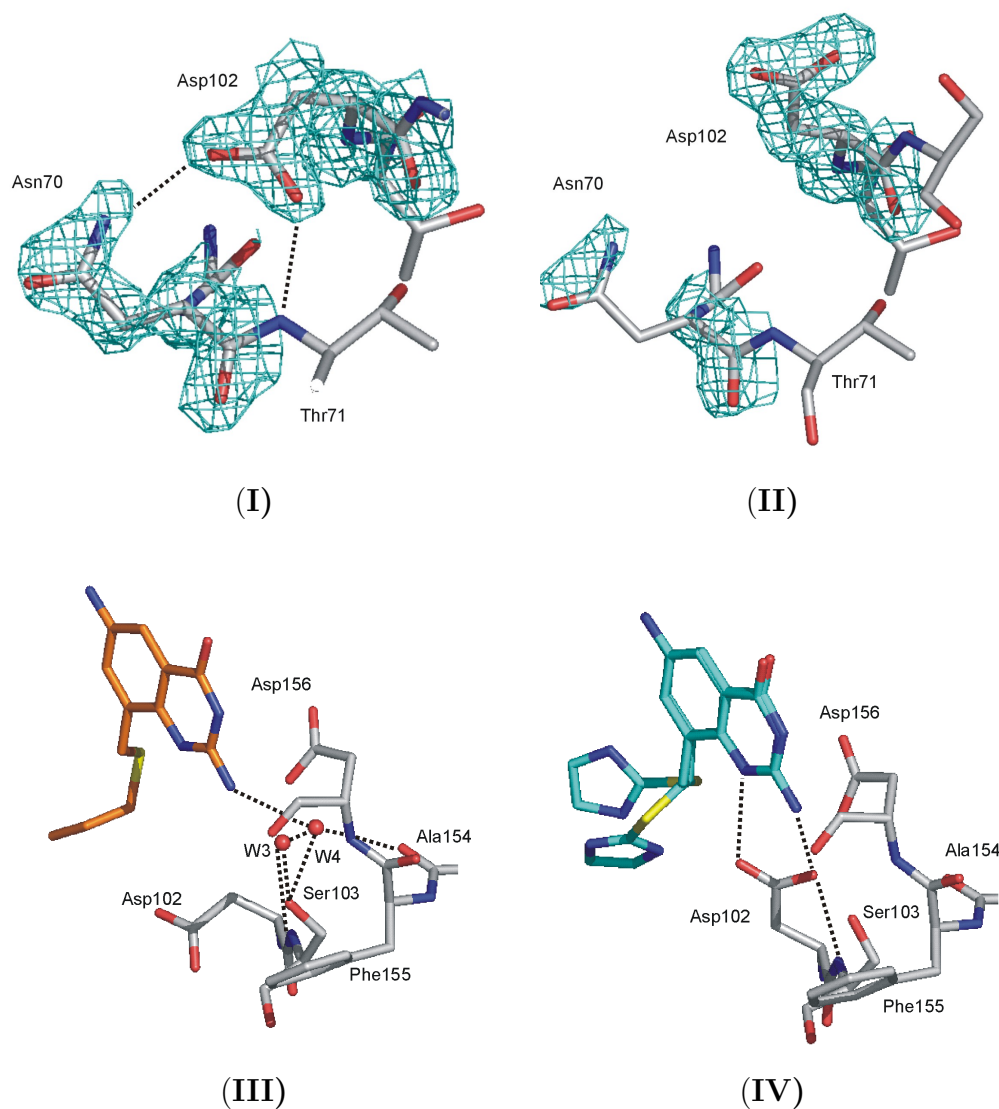
Die Peptidbindung von Leu231 zu Ala232 ist im Vergleich zur apo-Struktur bei pH 5,5 gedreht. Es wird nun wieder die Konformation, die auch in der apo-Struktur bei pH 8,5 vorliegt, angetroffen.





**Abb. 3.35** Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **54** bei einer Auflösung von 1,85 Å, kristallisiert bei pH 5,5. (I) Der Grundkörper des Liganden ist eindeutig in der |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (grün, konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) zu erkennen. Dichte für das Schwefelatom befindet sich sowohl vor als auch hinter der Ebene durch die Atome des Grundkörpers. (II) Der 2,6-Diamino-3*H*-chinazolin-4-on-Grundkörper und die anschließende Sulfanylmethyl-Gruppe sind eindeutig in der 2|Fo|-|Fc|-Elektronendichte des verfeinerten Strukturmodells (grünblau, konturiert auf 1,0  $\sigma$ ) zu erkennen. Die Seitenkette nimmt mindestens zwei Konformationen ein. Für den Imidazolring ist keine Dichte vorhanden. Das lässt darauf schließen, dass er in beiden Konformeren ungeordnet ist.

Bei pH 8,5 liegt die Seitenkette des Asp102 in Form zweier unterschiedlicher Rotamere vor: ein gut definiertes vom Ligand weggedrehtes und ein schlechter definiertes zum Ligand hinorientiertes Konformer (Abb. 3.31.IV). Bei pH 5,5 ist nur noch das zum Ligand hinorientierte Rotamer zu beobachten. Die Carboxylatgruppe dieses Aspartats bildet (unter der Annahme, dass der Chinazolinon-Ring bei pH 5,5 im Kristall protoniert vorliegt) eine gegabelte Wasserstoffbrücke zum Liganden mit einer Länge von je 3,0 Å aus. Diese Konformation der Seitenkette von Asp102 wurde zuvor in den Kristallstrukturen der *P. horikoshii* TGT im Komplex mit Guanin bzw. preQ<sub>0</sub>, kristallisiert bei pH 7,5 (Abb. 2.9 auf Seite 21), sowie in den apo-Strukturen der *Z. mobilis* D156A- und D156Y-TGT [Romier et al., 1996c] beobachtet. Um diese Bewegung durchführen zu können, muss das Wasserstoffbrücken-Netzwerk, in das Asp102 in der Kristallstruktur bei pH 8,5 eingebunden ist, gelöst werden (Abb. 3.36.I, II). Die Seitenkette von Asn70, dem Wasserstoffbrücken-Partner von Asp102 bei pH 8,5, ist dann ungeordnet.



**Abb. 3.36** pH-Abhängigkeit der Konformation von Asp102 (I, II) 2[Fo]-|Fc|-Elektronendichte, konturiert auf 1,0  $\sigma$ . (I) Bei pH 8,5 bildet Asp102 Wasserstoffbrücken zu Asn70 und Thr71 aus. (II) Bei pH 5,5 werden die Wasserstoffbrücken gelöst. In Folge ist Asn70 ungeordnet. (III) Bei pH 8,5 vermittelt ein Wassermolekül (W4) einen Kontakt zwischen Ala154, Ser103 und dem Liganden. Ein zweites Wassermolekül (W3) ist über W4 in ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk eingebunden. (IV) Bei pH 5,5 rotiert die Seitenkette von Asp102 zum Liganden und verdrängt die Wassermoleküle W3 und W4. Unter der Annahme, dass der Ligand protoniert ist, geht Asp102 dann eine gegabelte Wasserstoffbrücke mit ihm ein.

Des Weiteren werden zwei in ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk eingebundene Wassermoleküle (W3 und W4, Abb. 3.36) verdrängt. Einer der Carboxylatsauerstoffe von Asp102 nimmt dann in etwa die Position von W3 ein. Überlagert man die Strukturen TGT·54, kristallisiert bei pH 5,5, und TGT·54, kristallisiert bei pH 8,5, anhand der

C $_{\alpha}$ -Atome des Proteins, so beträgt der Abstand zwischen dem Wassermolekül W3 und dem Carboxylatsauerstoff 0,8 Å.

### 3.5.5 Ein dramatischer Einfluss von Schwefel auf die Bindungsenergie

Von den Verbindungen **53**, **56**, **57**, und **58** (Tab. 3.14) konnte keine Röntgenstruktur erhalten werden. Vermutlich nehmen sie einen vergleichbaren Bindungsmodus wie **54** und **55** ein, bei dem die Phenyl- und Cyclohexylgruppen in die lipophile Tasche ragen [Meyer et al., 2002].

Die Aktivität der Schwefelverbindung **56** ( $K_i = 100$  nM) ist 56- bzw. 36fach höher als die der Sauerstoff- und Kohlenstoff-Analoga (**57**,  $K_i = 5,6$   $\mu$ M bzw. **58**,  $K_i = 3,6$   $\mu$ M). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich eine Kombination aus hydrophoben, elektronischen und konformativen Effekten.

Unterschiede in den  $\log P$ -Werten<sup>4</sup> (**56**: 2,03; **57**: 1,47, **58**: 2,37) können eine Erklärung für den Unterschied in der Bindungsaffinität zwischen dem Sauerstoff- und dem Schwefelderivat bieten. Das Schwefelderivat mit dem höheren  $\log P$ -Wert sollte sich besser vom wässrigen Medium in die weniger polare Bindetasche verteilen. Beim Übergang vom wässrigen Medium in die Proteinbindetasche ist daher mit einem geringeren Aufwand für die Desolvatation zu rechnen. Schwefelatome sind schlechtere Wasserstoffbrücken-Akzeptoren als Sauerstoffatome. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Schwefelverbindung eine signifikant unterschiedliche freie Solvationsenergie besitzt. Berechnungen der Solvationsenergie ergaben allerdings keinen signifikanten Unterschied für die beiden Derivate (Ingo Dramburg, persönliche Mitteilung).

Die Bindung des Schwefelderivats profitiert weiter von der größeren Polarisierbarkeit des Schwefels im Vergleich zum Sauerstoff oder Kohlenstoff (Polarisationsvolumen für S: 3,00 Å<sup>3</sup>, O: 0,63 Å<sup>3</sup>, C: 1,80 Å<sup>3</sup>) [Fersht & Dingwall, 1979]. Daraus resultieren stärkere Dispersionswechselwirkungen.

Eine Suche nach verwandten Molekülen in der CAMBRIDGE STRUCTURAL DATABASE (CSD) [Allen et al., 1991] war die Basis für die Evaluierung von strukturellen und konformativen Unterschieden zwischen **56**, **57** und **58**. Der Phenylring der Inhibitoren ragt wahrscheinlich auf Grund der unterschiedlichen C-X-Bindungslängen (C(sp<sup>2</sup>)-

<sup>4</sup> $\log P$  ist ein Maß der Hydrophobizität;  $c$  = berechnet (calculated),  $P$  = Verteilungskoeffizient

S: 1,77 Å, C(sp<sup>2</sup>)-O: 1,37 Å, C(sp<sup>2</sup>)-C: 1,51 Å) verschieden tief in die lipophile Tasche. Diese Unterschiede werden durch den engeren C(sp<sup>2</sup>)-X-C(sp<sup>3</sup>)-Bindungswinkel am Schwefel (ca. 103° versus 118° für X = O und 113° für X = CH<sub>2</sub>) nur teilweise kompensiert. Für eine günstige Positionierung des Phenylrings in **56** (X = S), **57** (X = O) und **58** (X = CH<sub>2</sub>) muss der Torsionswinkel C(sp<sup>2</sup>)<sub>ortho</sub>-C(sp<sup>2</sup>)<sub>ipso</sub>-X-C(sp<sup>3</sup>) (Abb. 3.37) etwa bei 0° liegen. Eine statistische Auswertung der konformativen Präferenzen für diese Torsionswinkelfragmente anhand der Daten in der CSD ergibt eine Bevorzugung für X = S für 0°. Die Energiebarriere für den Übergang zu einen Torsionswinkel von 90° beträgt etwa 5 - 6 kJ/mol [Schaefer et al., 1991]. Für X = O wurde derselbe Vorzugswinkel gefunden. Allerdings beträgt in diesem Fall die Rotationsbarriere 15 kJ/mol [Schaefer et al., 1991]. Das Fragment mit X = CH<sub>2</sub> hingegen präferiert eher eine Anordnung von 90°. Hier beträgt die Rotationsbarriere etwa 5 kJ/mol [Schaefer et al., 1995]. Daher könnte die abfallende Aktivität des CH<sub>2</sub>-Derivats(**58**) zum Teil mit dem Energieaufwand zum Eingehen der energetisch ungünstigen koplanaren Anordnung erklärt werden.

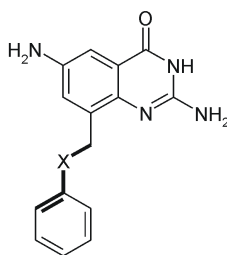


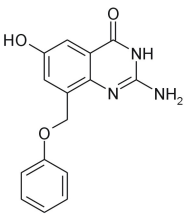
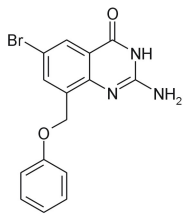
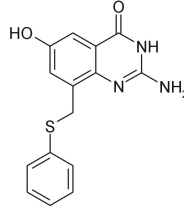
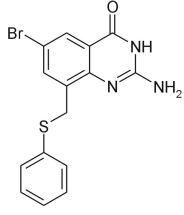
Abb. 3.37 Der Torsionswinkel C(sp<sup>2</sup>)<sub>ortho</sub>-C(sp<sup>2</sup>)<sub>ipso</sub>-X-C(sp<sup>3</sup>) ist fett markiert.

Der große Unterschied in der Bindungsaffinität zwischen einer Schwefel- und einer Sauerstoffverbindung konnte in zwei weiteren Vergleichsfällen belegt werden (Tab. 3.16). In einem Fall wurde die 6-Aminogruppe in **56** bzw. **57** durch eine Hydroxylgruppe ersetzt (**59**, **60**), im anderen durch Brom (**61**, **62**).

Diese Studie hat gezeigt, dass die lipophile Tasche, die durch Val45, Leu68 und Val282 gebildet wird, geeignet ist, durch eine Besetzung mit lipophilen Seitenketten am 2-Amino-3H-chinazolin-4-on-Grundkörper die Affinität dieser Derivate deutlich zu erhöhen.

Mit weiteren Derivaten von diesem Typ sollen die molekularen Erkennungseigenschaften des aktiven Zentrums der TGT in diesem Bereich genauer erforscht werden.

Tab. 3.16 Chinazolin-4-on-Derivate, die ebenfalls den starken Einfluss von Schwefel auf die Bindungsenergie zeigen.

Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]	Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
59		$4,6 \pm 1,4$	61		$11,9 \pm 2,2$
60		$0,25 \pm 0,05$	62		$1,1 \pm 0,05$

### 3.5.6 Weitere Chinazolin-4-on-Derivate

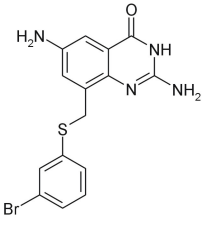
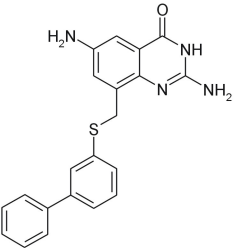
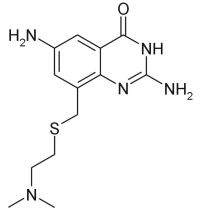
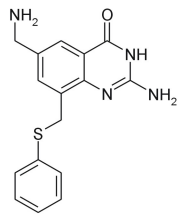
Im vorangegangenen Kapitel (Kapitel 3.5.5) wurde gezeigt, dass die lipophile Tasche, die durch Val45, Leu68 und Val282 gebildet wird, geeignet ist, die Affinität des 2-Amino-3*H*-chinazolin-4-on-Grundkörpers zu erhöhen. In diesem Kapitel werden Verbindungen diskutiert (Tab. 3.17), die entweder

- die lipophile Tasche weiter abtasten (**63**, **64**),
- Wasserstoffbrücken außerhalb der preQ<sub>1</sub>-Bindetasche eingehen sollen (**65**) oder
- die Wechselwirkung zu Leu231 verändern (**66**).

#### Chinazolin-4-one mit lipophilen Seitenketten in der 8-Position

Die Verbindungen **63** und **64** sind Abwandlungen von **56**, dem bisher affinsten 2,6-Diaminochinazolin-4-on-Derivat (Tab. 3.14 auf Seite 89). Im Vergleich zur Referenzverbindung besitzen sie eine größere lipophile Seitenkette in der 8-Position. Bei **63** befindet sich am Phenylring in meta-Position zusätzlich ein Bromatom, bei **64** ein weiterer Phenylring.

Tab. 3.17 Chinazolin-4-on-Derivate mit verschieden Substituenten.

Nr.	Name	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
63	2,6-Diamino-8-(3-bromophenylsulfanylmethyl)-3H-chinazolin-4-on		$0,6 \pm 0,1$
64	2,6-Diamino-8-(biphenyl-3-ylsulfanylmethyl)-3H-chinazolin-4-on		$1,5 \pm 0,1$
65	2,6-Diamino-8-(2-dimethylaminoethylsulfanylmethyl)-3H-chinazolin-4-on		$3,5 \pm 0,9$
66	2-Amino-6-aminomethyl-8-phenylsulfanylmethyl-3H-chinazolin-4-on		$1,7 \pm 0,4$

Die Bindungsenergie von Inhibitor **63** ist mit  $K_i = 0,6 \mu\text{M}$  geringfügig höher als die von **56** ( $K_i = 0,1 \mu\text{M}$ ). Der  $K_i$ -Wert von **64** hingegen ist um mehr als eine Größenordnung höher ( $K_i = 1,5 \mu\text{M}$ ). Von beiden Verbindungen konnte keine Kristallstruktur erhalten werden.

Wie eine Computermodellierung zeigt, scheint das Bromatom von der Größe her in die lipophile Tasche zu passen. Allerdings wird durch diesen Rest die Affinität nicht gesteigert. Es bleibt zu testen, ob andere Substituenten vergleichbarer Größe, aber mit etwas anderen Eigenschaften (z. B. eine Methylgruppe) besser geeignet sind.

Durch eine Biphenylgruppe anstelle eines Phenylrests wird die Affinität um mehr als das 10fache vermindert. Vermutlich können durch den zweiten Phenylring keine zusätzlichen günstigen Wechselwirkungen eingegangen werden. Wahrscheinlich ist der Rest für die lipophile Tasche zu groß. Rechnungen legen diese Vermutung nahe.

### Chinazolin-4-one mit basischen Resten

Verbindung **65** besitzt eine basische Dimethylaminoethylsulfanylmethyl-Seitenkette. In Ligand **66** ist die 6-Aminogruppe von **56** durch eine basischere Aminomethyl-Gruppe ersetzt. Dadurch verschiebt sich die geometrische Position dieser Donorgruppe am Grundgerüst.

Beide Verbindungen wurden zunächst bei pH 8,5 in Kristalle eindiffundiert. Die Strukturen wurden mit einer Auflösung von 1,7 bzw. 2,0 Å bestimmt. Für die Liganden konnte aber nur eine unvollständig definierte |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) erhalten werden (Abb. 3.38). Im Falle von **65** lässt sich mit einiger Vorsicht eine Platzierung des Liganden vorschlagen, im Falle von **66** kann keine sinnvolle Zuweisung vorgenommen werden.

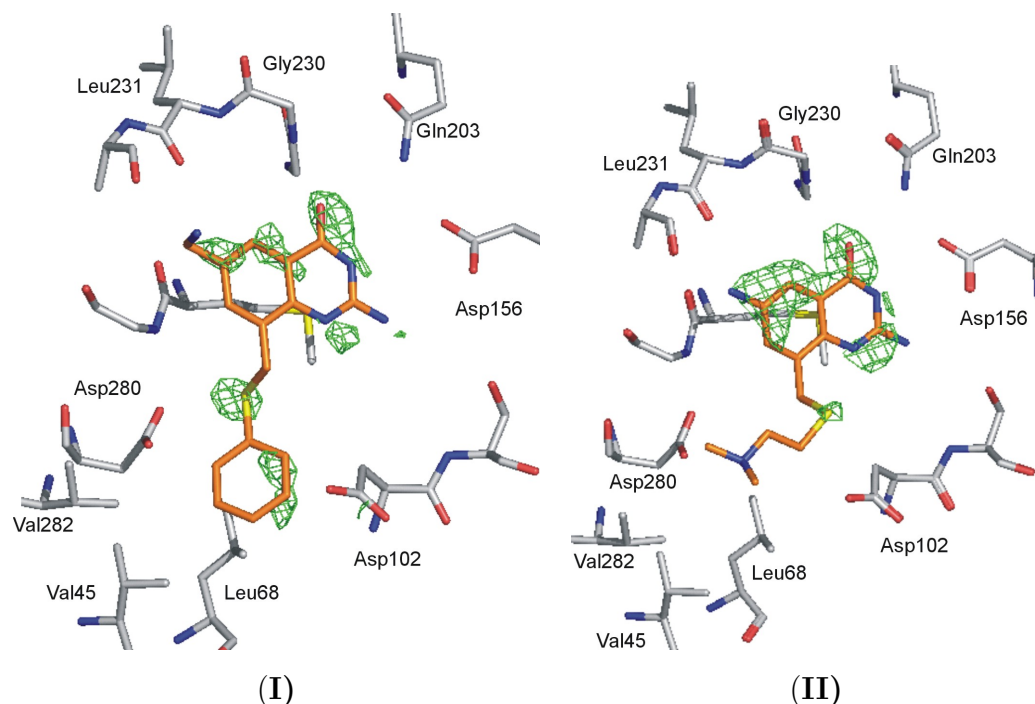
Bei pH 5,5 hingegen wurden wesentlich besser definierte |Fo|-|Fc|-Elektronendichten erhalten (Abb. 3.39 und 3.41).

### Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **65**

Die Kristallstruktur von TGT·**65** wurde bei pH 5,5 mit einer Auflösung von 2,1 Å bestimmt. Der 2,6-Diaminochinazolin-4-on-Grundkörper von **65** ist eindeutig in der |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) zu erkennen (Abb. 3.39.I). Das Schwefelatom der Sulfanylmethyl-Gruppe befindet sich in der dargestellten Ansicht vor der Ebene durch die Atome des Grundkörpers. Für die Dimethylaminoethyl-Gruppe ist auch nach der Verfeinerung keine Differenzelektronendichte zu erkennen (Abb. 3.39.II). Sie ist vermutlich ungeordnet.

TGT·**65** ist die einzige bisher bekannte Struktur, bei der die Sulfanylmethylen-Seitenkette nur eine Konformation annimmt, die ausschließlich einer Platzierung dieses Schwefels vor der Ebene durch die Atome des Grundkörpers in der hier verwendeten Darstellung (also auf der Tyr106 zugewandten Seite) entspricht.

Prinzipiell wäre es denkbar, dass die Aminomethyl-Gruppe, falls sie in protonierter Form vorliegt, eine Wasserstoffbrücke zu Asp280 eingeht. Dazu müsste sich aber die

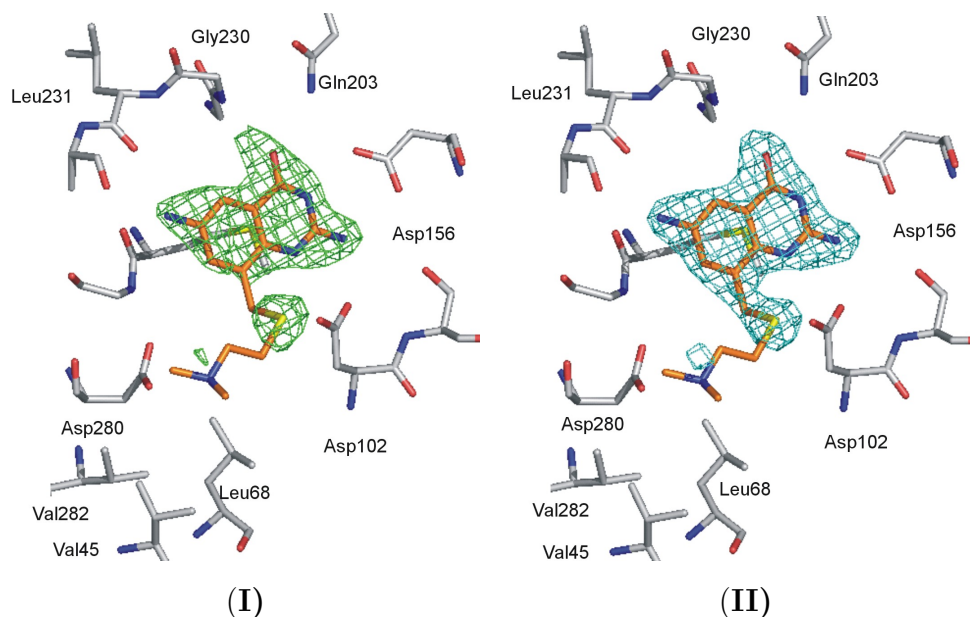


**Abb. 3.38** |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (grün, konturiert auf  $2,5 \sigma$ ) der Kristallstrukturen von *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **66** (I) bzw. **65** (II), kristallisiert bei pH 8,5. (Auflösung 1,7 (I) bzw. 2,0 Å(II)). Die Elektronendichten sind unvollständig definiert. Im Falle von **65** lässt sich mit einiger Vorsicht eine Platzierung des Liganden vorschlagen, im Falle von **66** kann keine sinnvolle Zuweisung vorgenommen werden.

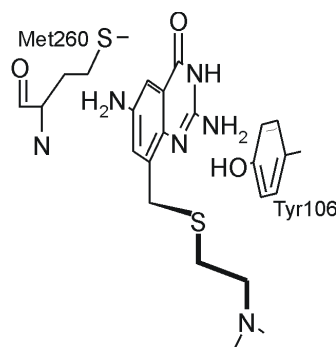
Sulfanylmethyl-Gruppe hinter der Ebene durch die Atome des Grundkörpers befinden. Außerdem müsste der Torsionswinkel  $S-C(sp^3)-C(sp^3)-N(sp^3)$  ca.  $65^\circ$  betragen (Abb. 3.40). Laut MIMUMBA ist dies zwar ein günstiger Torsionswinkel [Klebe & Mietzner, 1994]. Fast dreimal so viele Strukturen, die in der CSD enthalten sind, weisen aber einen Torsionswinkel von ca.  $175^\circ$  auf. In dieser Konformation kann die Seitenkette hinter der Ebene durch die Atome des Grundkörpers liegend keine Wasserstoffbrücke zu Asp280 eingehen. Die polare, vermutlich sogar protonierter Aminogruppe, würde in eine lipophile Tasche ragen. In der Kristallstruktur von TGT·**65** liegt das Schwefelatom vor der Ebene durch die Atome des Grundkörpers. Die Dimethylaminoethyl-Gruppe ist ungeordnet. Aus sterischen Gründen ist sowohl ein Torsionswinkel von ca.  $65^\circ$  als auch  $175^\circ$  für die Seitenkette erlaubt. Zu dem kann die polare Aminogruppe gut solvatisiert werden. Das könnte ein Grund dafür sein, warum die Sulfanylmethyl-Gruppe sich nur vor der Grundkörperebene befindet.

Der  $K_i$ -Wert von **65** liegt mit  $3,5 \mu M$  im Bereich von **53** ( $K_i = 5,4 \mu M$ ) und **55** ( $K_i = 5,5 \mu M$ ) (Tab. 3.14 auf Seite 89). Beide Verbindungen besitzen eine aliphatische lipophile Seitenkette (Cyclohexyl bzw. Propyl) anstelle der in **65** vorhandenen





**Abb. 3.39** Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **65** bei einer Auflösung von 2,1 Å, kristallisiert bei pH 5,5. (I) Die  $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte (grün, konturiert auf  $2,5 \sigma$ ) des Chinazolin-4-on-Grundkörpers ist gut definiert. (II) Der Grundkörper und die Sulfanylmethyl-Gruppe sind eindeutig in der  $2|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte des verfeinerten Strukturmodells (grünblau, konturiert auf  $1,0 \sigma$ ) zu erkennen. Das Schwefelatom der Ligandseitenkette befindet sich in der dargestellten Ansicht vor der Ebene durch die Atome des Grundkörpers. Für die Dimethylaminoethyl-Gruppe ist keine Differenzdichte zu erkennen. Sie ist wahrscheinlich ungeordnet.



**Abb. 3.40** Skizze des kristallographisch bestimmten Bindungsmodus von **65**. Das Schwefelatom der Seitenkette befindet sich auf der Tyr106 zugewandten Seite. Der Torsionswinkel  $S-C(sp^3)-C(sp^3)-N(sp^3)$  ist fett markiert.

Dimethylaminoethyl-Gruppe. Offensichtlich führt eine polare, vermutlich sogar geladene terminale Aminogruppe an dieser Position nicht zu einem die Bindungsenergie steigernden Effekt. Der Beitrag zur Bindungsenergie dieser drei Gruppen erscheint in diesem System etwa gleich groß. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei der Optimierung der Pterine gemacht (Kapitel 3.4.3).

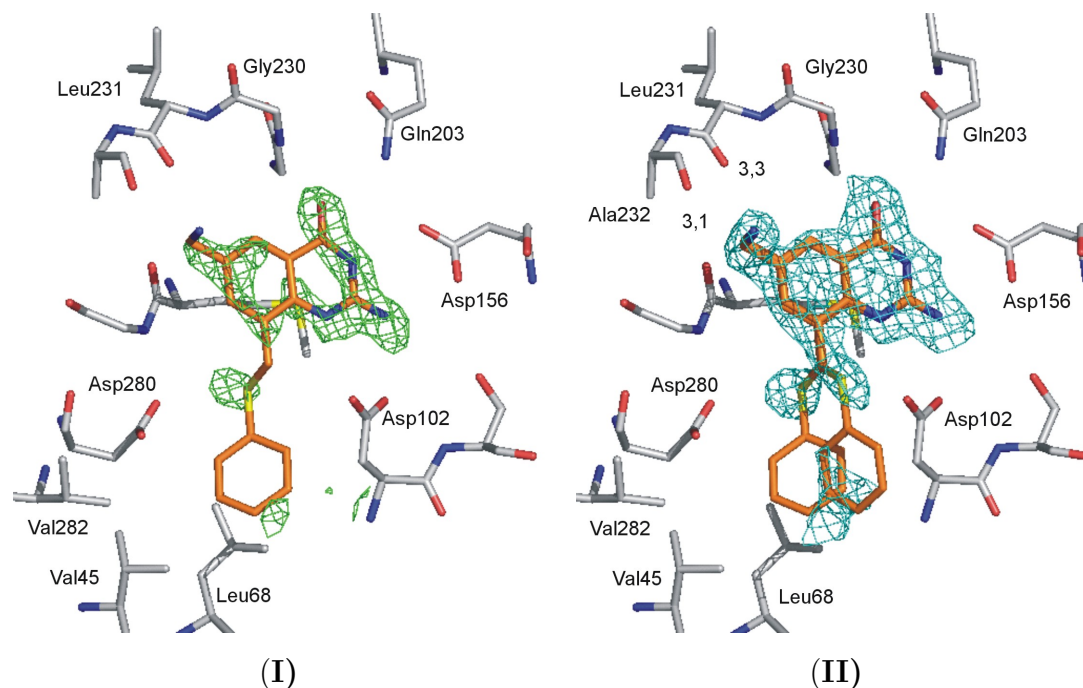
### Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **66**

Verbindung **66** ist ein Derivat von **56** (Tab. 3.14 auf Seite 89), in dem die aromatische NH<sub>2</sub>-Gruppe in 6-Position durch eine basischere Aminomethyl-Gruppe ersetzt wurde. Eine solche aliphatische Aminogruppe kommt ebenfalls in dem natürlichen Substrat preQ<sub>1</sub> vor. Verglichen zu einer aromatischen Aminogruppe ist eine aliphatische Aminogruppe stärker basisch. Dadurch ist der Inhibitor besser in polaren Lösungsmitteln löslich (E. Meyer, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz zu **56** konnte **66** bei pH 5,5 erfolgreich in einen Kristall eindiffundiert werden (Abb. 3.41).

Die Struktur wurde bei einer Auflösung von 1,75 Å bestimmt. Die |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) ist zerrissen. Das lässt auf eine unvollständige Population des Liganden in der Bindetasche schließen. Nach der Verfeinerung ist für die Sulfanylmethyl-Gruppe Dichte sowohl hinter als auch vor der Ebene durch die Atome des Chinazolin-4-on-Grundkörpers zu erkennen. Für den Phenylring ist keine zusammenhängende Elektronendichte zu sehen. Er wurde in die Verfeinerung nicht miteinbezogen.

In Tab. 3.18 sind die Distanzen der Wasserstoffbrücken zwischen den Donoren bzw. Akzeptoren des Chinazolin-4-on-Grundkörpers und den entsprechenden Partnern auf Proteinseite der Kristallstrukturen der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit verschiedenen Liganden aufgelistet. In TGT·**66** liegen die Abstände im vergleichbaren Bereich wie in den Strukturen der Komplexe mit 2,6,-Diamino-3*H*-chinazolin-4-onen. Durch die geometrisch verlängerte Aminomethyl-Gruppe in **66** wird demnach die Bindungsgeometrie des Grundkörpers nicht entscheidend verändert oder gestört.

Überlagert man die Anordnungen der Bindetaschen anhand der C $\alpha$ -Koordinaten von TGT·**65** und TGT·**66**, so fallen die Chinazolin-4-on-Grundkörper fast exakt aufeinander (Abb. 3.42). Das Kohlenstoffatom der Aminomethyl-Gruppe von **66** befindet sich dort, wo in der Kristallstruktur von TGT·**65** die 6-Aminogruppe zu liegen kommt. Der Abstand zum Carbonyl-Sauerstoff von Leu231 beträgt nur 3,0 Å. Legt man den Abstand von 3,3 Å und den Winkel C<sub>Leu231</sub>-O<sub>Leu231</sub>-8-NH<sub>2</sub> (160°) zu Grunde, muss man davon ausgehen, dass die Aminogruppe in **66** eine schwächere Wasserstoffbrücke zu Leu231 ausbildet als in den anderen Chinazolin-4-on-Derivaten. Sie scheint aber zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Ala232 auszubilden. Obwohl anzunehmen ist, dass diese Aminomethyl-Gruppe in **66** wegen ihres höheren basischen Charakters protoniert vorliegt, liefert sie keinen erhöhten Bindungsbeitrag, wie das üb-

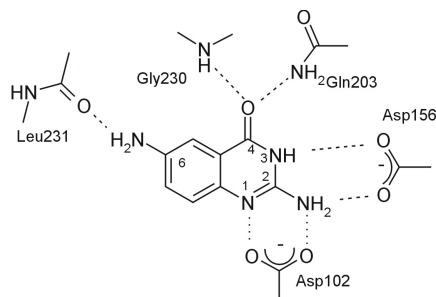


**Abb. 3.41** Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **66** bei einer Auflösung von 1,75 Å, kristallisiert bei pH 5,5. (I) Die |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (grün, konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) des Chinazolin-4-on-Grundkörpers ist zerrissen. Das lässt auf eine unvollständige Population des Liganden in der Bindetasche schließen. (II) Der Grundkörper und die Sulfanylmethyl-Gruppe sind eindeutig in der 2|Fo|-|Fc|-Elektronendichte des verfeinerten Strukturmodells (grünblau, konturiert auf 1,0  $\sigma$ ) zu erkennen. Die Sulfanylmethyl-Gruppe der Ligandseitenkette nimmt zwei Konformationen ein. Der Phenylring ist in der Differenzdichte nicht zu erkennen. Das Stickstoffatom der Aminomethyl-Gruppe kommt in 3,3 Å Entfernung zur Carbonylgruppe des Leu231 und 3,1 Å zur Carbonylgruppe von Ala232 zu liegen.

licherweise für eine ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke zu erwarten wäre [Böhm & Klebe, 1996; Davis & Teague, 1999; Gohlke & Klebe, 2002].

Da die Bindungsgeometrie des Grundkörpers vergleichbar zu den bisher bekannten ist, kann spekuliert werden, dass die Phenylsulfanylmethyl-Seitenkette ebenfalls eine sehr ähnliche Bindungsgeometrie wie in der analogen Verbindung **56** einnimmt. Im Vergleich zu **56** ist ihr  $K_i$ -Wert aber um mehr als Faktor 10 schlechter. Grund hierfür ist vermutlich die suboptimale Wasserstoffbrückengeometrie der Aminomethyl-Gruppe zu Leu231. Die Wichtigkeit dieser Wechselwirkung ist schon aus anderen Beispielen bekannt (Kapitel 3.5.1, Grädler et al. [2001]). Trotz Ladungsunterstützung und einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke zu Ala232 kann diese Abschwächung offensichtlich nicht kompensieren werden, zumal der kurze Abstand zwischen dem Carbonylsauerstoff in

Tab. 3.18 Distanzen der Wasserstoffbrücken zwischen den Donoren bzw. Akzeptoren des Chinazolin-4-on-Grundkörpers und den entsprechenden Partnern auf Proteinseite der Kristallstrukturen der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit verschiedenen Chinazolin-4-onen. (Längen in Å).



Nr.	pH	6-NH <sub>2</sub> ↔Leu231	O↔Gly230	O↔Gln203
51	8,5	2,5	2,8	3,0
51	5,5	2,8	2,9	2,9
54	8,5	2,7	2,8	3,5
54	5,5	2,8	2,9	2,9
55	8,5	2,6	3,0	3,5
65	5,5	3,0	2,9	3,2
66	5,5	3,3 <sup>*)</sup>	2,9	3,2

<sup>\*)</sup> 6-Aminomethyl-Gruppe

Nr.	pH	N3↔Asp156	2-NH <sub>2</sub> ↔Asp156	N1↔Asp102	2-NH <sub>2</sub> ↔Asp102
51	8,5	3,0	3,0	(3,4)	(3,2)
51	5,5	2,7	2,7	2,7	2,7
54	8,5	3,7	3,5	(3,2)	(3,3)
54	5,5	2,9	2,9	3,0	2,8
55	8,5	3,7	3,6	-	-
65	5,5	2,8	2,9	2,9	2,9
66	5,5	2,9	2,9	2,9	2,9

Leu231 und dem Methylenkohlenstoff des Liganden auf repulsive Wechselwirkungen verweist.

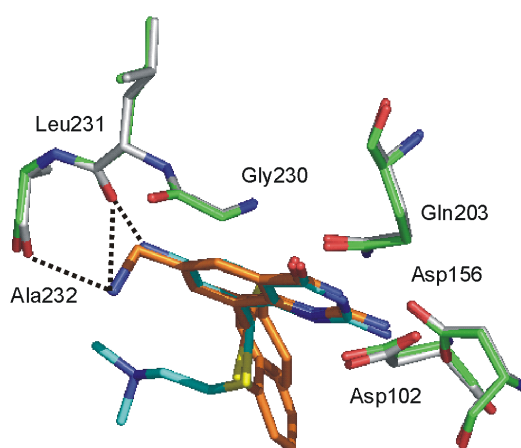


Abb. 3.42 Überlagerung der Bindetaschen der Kristallstrukturen von **65** (grün) und **66** (grau) im Komplex mit *Z. mobilis* TGT. Die Chinazolin-4-on-Grundkörper der beiden Liganden fallen fast exakt aufeinander. Das Kohlenstoffatom der Aminomethyl-Gruppe von **66** ist dort, wo in der Kristallstruktur von TGT·**65** die aromatische Aminogruppe zu liegen kommt.

### 3.5.7 Imidazochinazolinon als Erweiterung der Chinazolinone

Eine genau Analyse der Kristallstrukturen der Chinazolin-4-one im Komplex mit *Z. mobilis* TGT hat ergeben, dass sich benachbart zur 7-Position der Liganden bisher noch unbesetzter Raum befindet. Durch eine Erweiterung des Chinazolinons zu Imidazochinazolinon (Abb 3.43) sollte dieser besser gefüllt werden.

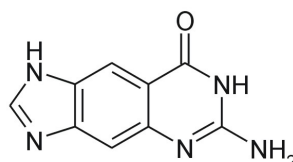


Abb. 3.43 6-Amino-1,7-dihydroimidazo[4,5-g]chinazolin-8-on (**67**).

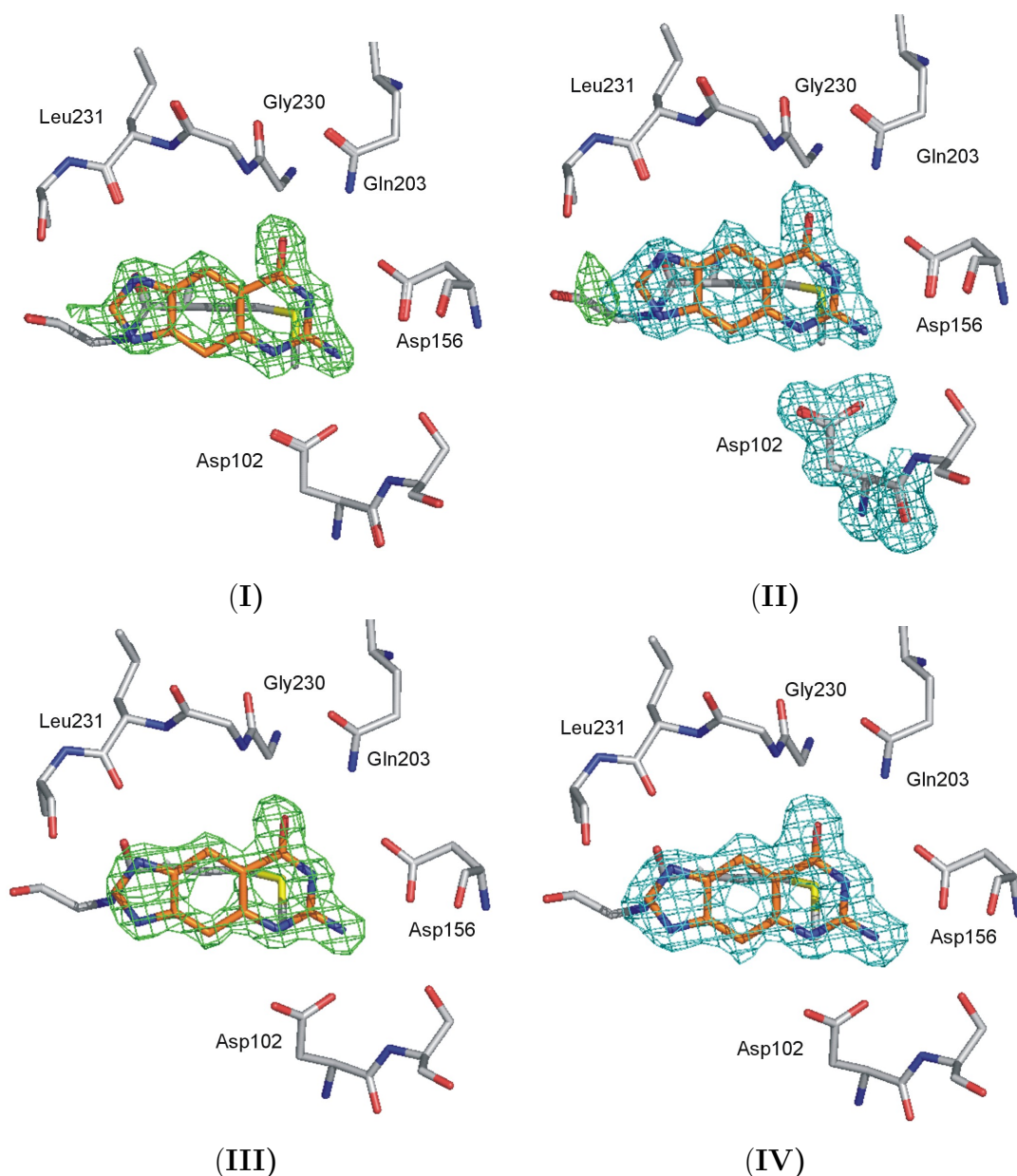
Zunächst wurde **67** bei pH 8,5 in einen Kristall eindiffundiert. Die Kristallstruktur konnte mit einer Auflösung von 1,7 Å bestimmt werden. Es wurde eine durchgängige |Fo|-|Fc|-Elektronendichte (konturiert auf 2,5  $\sigma$ ) für den Liganden erhalten (Abb. 3.44.I). Überraschenderweise befindet sich in der dargestellten Ansicht links neben dem Imidazolring Differenzdichte in etwa der Größe einer Methylgruppe. Für ein dort platziertes Wassermolekül ist der Abstand zum Inhibitor zu kurz. Diese überschüssige Elektronendichte bleibt auch nach der anschließenden Verfeinerung erhalten (Abb. 3.44.II).

Offensichtlich ist die gefundene Elektronendichte nicht mit der Strukturformel des für das „Soaking“ verwendeten Inhibitors **67** in Einklang zu bringen.

Obwohl das NMR-Spektrum der Verbindung **67** keine Hinweise dafür enthält, ließ sich nicht völlig ausschließen, dass die Substanz bei den „Soaking“-Experimenten ausschließlich vorlag. In Frage kommt eine Substitution mit einer Hydroxy- oder Aminogruppe (E. Meyer, persönliche Mitteilung). Deshalb wurde das „Soaking“ mit einer Probe einer neu synthetisierten Charge wiederholt. Bei der Synthese dieser Charge wurde sehr genau auf die Reinigung geachtet. Die Eindiffundierung der Substanz war bei pH 8,5 interessanterweise nicht mehr möglich. Bei pH 5,5 konnte sie aber erfolgreich durchgeführt werden. Die Struktur konnte mit einer Auflösung von 1,7 Å bestimmt werden. Die  $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte (konturiert auf  $2,5 \sigma$ ) weist keine Bereiche auf, die nicht von einem Ligandatom besetzt werden (Abb. 3.44.III). Das missglückte „Soaking“ mit der neuen Charge bei pH 8,5 legt ebenfalls nahe, dass bei den ersten Versuchen eine substituierte Verbindung als Verunreinigung vorlag. Der offensichtlich zusätzliche polare Substituent in 2-Position in der ersten Charge erhöht entweder die Löslichkeit und /oder die Affinität dieses Derivats so stark, dass selbst bei diesem pH-Wert eine ausreichende Populierung des Liganden in der Bindetasche gelang.

TGT·**67** ist die einzige bisher bekannte Struktur, bei der Asp102 bei einem pH von 8,5 nur die eine zum Ligand hinorientierte Konformation einnimmt. Der  $K_i$ -Wert, der an dieser vermutlich verunreinigten Charge bestimmt wurde, ist mit  $0,15 \pm 0,05 \mu\text{M}$  um mehr als Faktor 10 niedriger im Vergleich zu dem von 2,6-Diamino-8-bromo-3*H*-chinazolin-4-on (**51**), dem undekorierten Grundkörper der Chinazolinon-Serie. Der  $K_i$ -Wert der reinen Verbindung **67** liegt mit  $0,25 \pm 0,05 \mu\text{M}$  etwas höher als für die verunreinigte Charge. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass das bisher noch nicht vollständig charakterisierte Derivat mit einem Substituenten in 2-Position (vermutlich OH oder NH<sub>2</sub>) eine höhere Affinität zur *Z. mobilis* TGT besitzt.

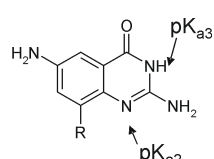
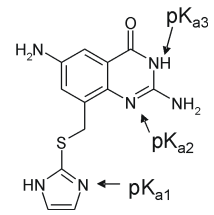
Da Asp102 eine gegabelte Wasserstoffbrücke zu **67** eingeht, liegt die Verbindung vermutlich protoniert vor. Um dies näher zu untersuchen, wurden die  $pK_a$ -Werte einiger Verbindungen der Chinazolinon-Serie sowie des reinen Imidazochinazolinons bestimmt (Tab. 3.19). Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit konnte von manchen Inhibitoren nur ein Wert in einer 20 %igen DMSO-Lösung, wie sie auch zum „Soaking“ verwendet wird (Kapitel 5.3.3), bestimmt werden. Die  $pK_a$ -Werte von Verbindungen, die sowohl im wässrigen Milieu als auch in 20 % DMSO gemessen wurden (**52**, **55**), sind prak-



**Abb. 3.44** Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit **67** bei einer Auflösung von 1,7 Å, kristallisiert bei pH 8,5 (I, II) bzw. pH 5,5 (III, IV). Die Charge, die bei der Kristallisation bei pH 8,5 verwendet wurde, ist vermutlich verunreinigt. Für die Kristallisation wurde eine aufwändiger gereinigte Probe verwendet. (I, III) Die  $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte (grün, konturiert auf  $2,5 \sigma$ ) ist sehr gut definiert. (I) Neben dem Imidazolring ist zusätzliche  $|F_o| - |F_c|$ -Dichte in der Größe einer Methylgruppe zu erkennen. (II) Diese zusätzliche Dichte bleibt auch nach der Verfeinerung des Strukturmodells ( $2|F_o| - |F_c|$ -Dichte, grünblau, konturiert auf  $1,0 \sigma$ ) bestehen. Asp102 orientiert sich bei beiden pH-Bedingungen zum Liganden hin. (III, IV) Die Kristallisation bei pH 5,5 mit der gereinigten Verbindung ergibt eine eindeutig zu interpretierende  $|F_o| - |F_c|$ - (grün, konturiert auf  $2,5 \sigma$ ) bzw.  $2|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte (grünblau, konturiert auf  $1,0 \sigma$ ). Hier ist keine zusätzliche Dichte in der Nähe der 2-Position von **67** zu erkennen.

tisch identisch. Somit hat in diesem Fall DMSO keinen entscheidenden Einfluss auf den  $pK_a$ -Wert.

**Tab. 3.19**  $pK_a$ -Werte verschiedener Chinazolinone und des Imidazochinazolinons. ( $pK_{a1}$  = Imidazol-Teilstruktur (falls vorhanden);  $pK_{a2}$  = Guanidin-Teilstruktur;  $pK_{a3}$  = 2-Amino-3H-pyrimidin-4-on-Teilstruktur, nd = nicht bestimmt.

Nr.	Medium	$pK_a$		
		$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
				
<b>51</b> ,				
<b>52</b> ,	wässrig	-	4,4	9,1
<b>55</b> ,	wässrig	-	4,5	nd
<b>56</b>	DMSO	-	4,4	9,8
				
<b>54</b>	wässrig		4,4	9,6
	DMSO	-	4,2	9,9
<b>54</b>	DMSO	5,3	3,5	9,8
<b>56</b>	DMSO	-	3,8*	10,2*
<b>67</b>	DMSO	4,5	< 3,5	9,9

\* Wegen der schlechten Löslichkeit der Verbindung sind diese Werte mit einem größerem Fehler behaftet.

Der  $pK_{a2}$ -Wert von **67** ( $pK_a$ -Wert der Guanidin-Teilstruktur) ist mit der verwendeten Messmethoden nicht bestimmbar (Kapitel 5.5). Er ist deutlich tiefer als 3,5. Damit lässt sich nicht erklären, warum sich beim „Soaking“ mit der verunreinigten Charge bei pH 8,5 die Seitenkette von Asp102 ausschließlich zum Liganden dreht. Da sich die reine Verbindung aber nicht in Kristalle der TGT bei pH 8,5 eindiffundieren ließ, bleibt unklar, ob dort auch die Konformationsänderung der Seitenkette von Asp102 erfolgt. Denkbar wäre auch, dass der Substituent der Verunreinigung eine deutliche  $pK_a$ -Wert-Verschiebung verursacht, was für einen OH- oder NH<sub>2</sub>-Substituenten in 7-Stellung zu erwarten wäre. Um dies zu klären, müsste die Struktur der Verunreinigung aufgeklärt und die Verbindung gezielt synthetisiert werden.

Verbindung **67** ist der bisher affinste bekannte Grundkörper eines TGT-Inhibitors. Mit einer Affinität im submikromolaren Bereich sowie einem verifizierten Bindungsmodus stellt der Verbindung eine hervorragende Ausgangsbasis für eine weitere Optimierung dar. Wie sich auf Grund der Affinitätsbestimmung mit der verunreinigten Charge andeutet, scheint das substituierte Derivat eine noch höhere Affinität gegen das Enzym zu



besitzen. Weiterhin schient die Wasserlöslichkeit dieser Verbindungsklasse sehr günstig zu sein.

### 3.5.8 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

2-Amino-3*H*-chinazolin-4-on wurde als neue Leitstruktur für TGT-Inhibitoren entworfen. Mittels der Kristallstrukturanalyse konnte der angenommene Bindungsmodus verifiziert werden.

Der  $K_i$ -Wert von 2,6-Diamino-8-bromo-3*H*-chinazolin-4-on (**51**) liegt bereits im unteren mikromolaren Bereich (Kapitel 3.5.1). Die Verbindung stellt deshalb eine gute Ausgangsbasis für weitere Optimierungen dar.

Ausgehend von dieser Verbindung wurden Derivate mit lipophilen Seitenketten synthetisiert (Kapitel 3.5.2 und 3.5.5). Dabei wurde ein großer Einfluss des Schwefels in der Seitenkette auf die Bindungsenergie beobachtet. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine lipophile Tasche, die durch Val45, Leu68 und Val282 gebildet wird, geeignet ist, um die Affinität der Inhibitoren zu erhöhen.

Bisher ist es nicht gelungen, durch andere Variationen der Seitenketten, die Affinität dieser Inhibitorklasse weiter zu steigern (Kapitel 3.5.6).

Imidazochinazolinon stellt eine sehr viel versprechende Erweiterung der Chinazolinone dar (Kapitel 3.5.7). Die Affinität des undekorierten Grundkörpers fällt bereits in den submikromolaren Bereich. Der Bindungsmodus dieser Verbindung konnte ebenfalls mittels Kristallstrukturanalyse aufgeklärt werden. Der gefundene Bindungsmodus bestätigt die angenommene Orientierung in der Bindetasche.

Um die Löslichkeit der Liganden zu erhöhen und dadurch ein besseres Eindiffundieren der Liganden in TGT-Kristalle zu erzielen, wurden Kristallisationsbedingungen bei pH 5,5 etabliert (Kapitel 3.5.3). Die Kristallstruktur ändert sich bei diesen Bedingungen im Vergleich zu der bei pH 8,5 in zwei Bereichen gegenläufig. Der eine Bereich, Teil eines Faltblattes, ist komplett ungeordnet, der andere Bereich, Teil einer Helix, ist wesentlich besser definiert. In der Bindetasche klappt die Amidbindung zwischen Leu231 und Ala232 um.

Bei der Bindung zweier Chinazolinone (**51**, **65**) bei pH 8,5 werden für die Seitenkette von Asp102 zwei unterschiedliche Konformationen beobachtet: einmal orientiert sie sich zum Liganden hin, einmal steht sie von ihm weg. Bei pH 5,5 ist nur die zum Ligand hinorientierte Konformation zu erkennen. In dieser Konformation geht die Carboxylatgruppe eine gegabelte Wasserstoffbrücke zum Liganden ein. Vermutlich wird

diese Geometrie durch die dann vorliegende Protonierung des Chinazolinongerüsts erzwingen. Das legt nahe, dass die Eigenschaften des Grundkörpers so zu verändern sind, dass eine ausreichende Protonierung an dieser Stelle auch bei physiologischen pH-Wert gegeben ist.

Durch die Rotation von Asp102 zum Liganden werden zwei Wassermoleküle aus der Bindetasche verdrängt (Kapitel 3.5.4 und 3.5.7). Auf diese Wassermoleküle wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

## 3.6 Virtuelles Screening nach Verbindungen, die geordnete Wassermoleküle aus der Bindetasche verdrängen

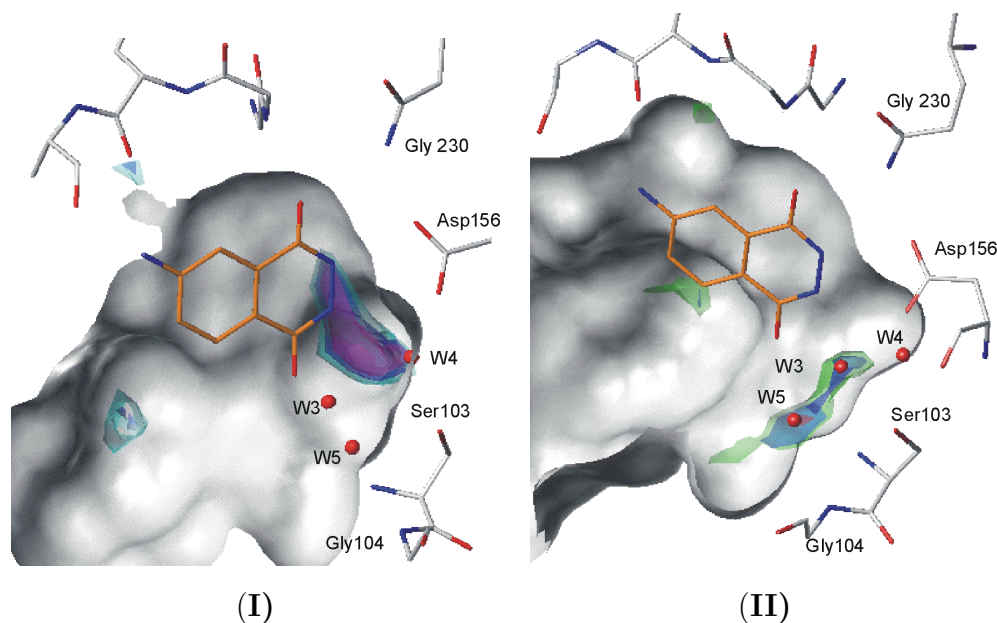
Im vorangegangenen Abschnitt wurden Kristallstrukturen der TGT im Komplex mit Chinazolinonen beschrieben (Kapitel 3.5). Bei der Analyse der Strukturen ist aufgefallen, dass die Seitenkette von Asp102 bei bestimmten Liganden bei pH 8,5 (Abb. 3.27 auf Seite 84, Abb. 3.31.IV auf Seite 90 und Abb. 3.44.II auf Seite 113) sowie bei allen Liganden bei pH 5,5 (Kapitel 3.5.4) ihre Konformation im Vergleich zur apo-Struktur ändert. Dabei wird das Wasserstoffbrücken-Netzwerk, in das Asp102 im ungebundenen Zustand involviert ist, aufgebrochen und die Seitenkette dreht sich zum Liganden hin. Die Carboxylatgruppe geht dann, unter der Annahme, dass der Ligand protoniert vorliegt, eine gegabelte Wasserstoffbrücke zu ihm ein (Abb. 3.36). In der Folge werden zwei Wassermoleküle (W3 und W4) aus der Bindetasche verdrängt.

Diese Beobachtung gab Anlass, diesen Bereich des aktiven Zentrums mit einer „Hot Spot“-Analyse genauer zu charakterisieren.

### 3.6.1 „Hot Spot“-Analyse der Bindetasche

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass „Hot Spots“, berechnet mit den Programmen SUPERSTAR [Verdonk et al., 1999] und DRUGSCORE [Gohlke et al., 2000b], gut mit den in den Kristallstrukturen der *Z. mobilis* TGT gefundenen Ligandatomen übereinstimmen (Kapitel 3.3.1).

In Abb. 3.45 sind die „Hot Spots“, berechnet für eine Wasserstoffbrücken-Donor- und eine -Akzeptor-Sonde, gezeigt. Das Wassermolekül W4 befindet sich an einer nur schwer zugänglichen Position außerhalb eines auf 80 % konturierten Wasserstoffbrücken-Donor-„Hot Spots“ (Abb. 3.45.I). Das Wassermolekül W3 dagegen fällt ins Zentrum eines Wasserstoffbrücken-Akzeptor-„Spots“ (Abb. 3.45.II). Ein zusätzliches Wassermolekül (W5) befindet sich ebenfalls in einem als günstig für einen Akzeptor berechneten Bereich. Dieses Wassermolekül ist in allen TGT-Strukturen im Komplex mit Pyridazindionen [Grädler et al., 2001] sowie in einigen Komplexen mit Chinazolinonen enthalten. Das Wassermolekül W4 ist durch seine unzugängliche Position wahrscheinlich nur schwer durch einen Liganden verdrängbar. Die Wassermoleküle W3



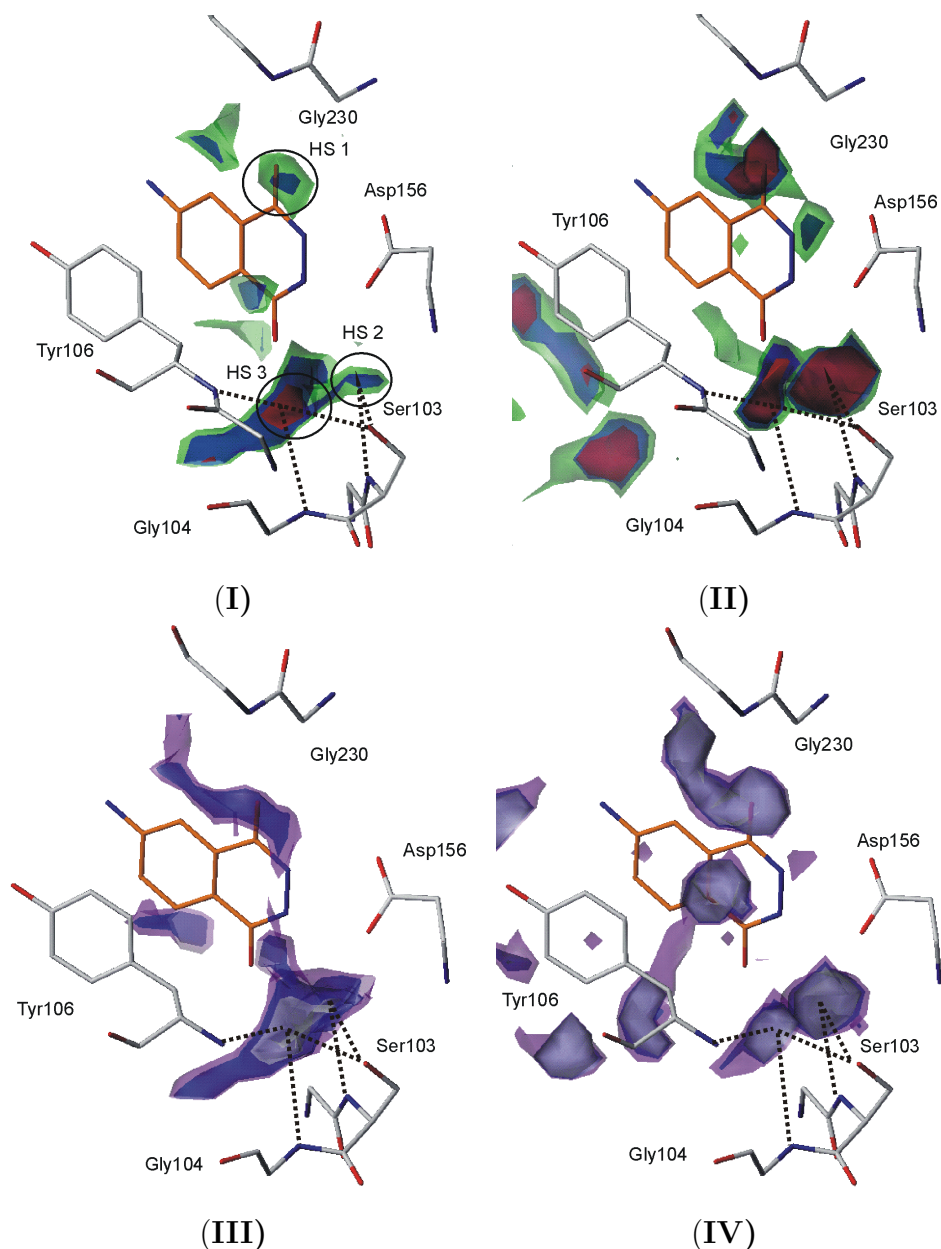
**Abb. 3.45 „Hot Spots“ in der Bindetasche der TGT.** Zur Orientierung ist die kristallographisch bestimmte Bindungsgeometrie des Inhibitors **4** (orange) gezeigt. (I) „Hot Spots“ berechnet für eine Wasserstoffbrücken-Donor-Sonde (N.3) mit DRUGSCORE, konturiert auf 80 (grünblau), 84 (blau) und 88 % (violett); das Wassermolekül W4 befindet sich nicht einem Donor-„Hot Spot“. (II) „Hot Spots“ berechnet für eine Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Sonde (O.2) mit DRUGSCORE, konturiert auf 80 (grün), 84 (blau) und 92 % (rot); das Wassermolekül W3, das durch die Rotation von Asp102 aus der Bindetasche verdrängt werden kann, sowie ein weiteres Wassermolekül W5 befinden sich an einer als günstig für Wasserstoffbrücken-Akzeptoren vorhergesagten Position.

und W5 hingegen nehmen gut zugängliche Positionen in der Bindetasche ein.

Eine weitere Charakterisierung der Bindetasche in diesem Bereich ist in Abb. 3.46 dargestellt. Zur Berechnung der „Hot Spots“ wurde sowohl DRUGSCORE als auch Superstar verwendet. Als Akzeptor-Sonden wurden eine neutrale Carbonyl-Sauerstoff- sowie eine negativ geladene Carboxylat-Sauerstoff-Sonde gewählt (Abb. 3.46).

Beide Sonden zeigen günstige Wechselwirkungsfelder (HS 1) im Bereich der 4-Carbonylgruppe des dargestellten Liganden (**4**). Ein weiterer, sehr breiter „Hot Spot“ mit zwei Maxima (HS 2 und 3) befindet sich unterhalb von Asp156. In der Nähe dieser Maxima befinden sich die Wassermoleküle W3 und W5 (Abb. 3.45.II).

Die „Hot Spots“ aller verwendeten Akzeptor-Sonden verweisen auf die gleichen Positionen in der Nähe von Gly230 sowie Ser103 und Gly104. HS 1 entsteht aus den Wechselwirkungsmöglichkeiten zu Gly230 und Glu203. HS 2 resultiert aus den Donoreigenschaften der  $\alpha$ -NH-Gruppen von Tyr106 und Gly104 sowie der Hydroxylgruppe



**Abb. 3.46 Wasserstoffbrücken-Akzeptor-„Hot Spots“ in der Bindetasche der TGT.** Zur Orientierung ist auch die kristallographisch bestimmte Bindungsgeometrie des Inhibitors **4** (orange) gezeigt. (I) „Hot Spots“ berechnet für eine Carbonyl-Sauerstoff-Sonde (O.2) mit DRUGSCORE, konturiert auf 80 (grün), 84 (blau) und 92 % (rot); (II) „Hot Spots“ berechnet für eine Carbonyl-Sauerstoff-Sonde mit SUPERSTAR, konturiert auf die Wahrscheinlichkeitsniveaus 4 (grün), 8 (blau) und 10 (rot); (III) „Hot Spots“ berechnet für eine Carboxylat-Sauerstoff-Sonde (O.co2) mit DRUGSCORE, konturiert auf 80 (violett), 83 (blau) und 90 % (grau); (IV) „Hot Spots“ berechnet für eine Carboxylat-Sauerstoff-Sonde mit SUPERSTAR, konturiert auf die Wahrscheinlichkeitsniveaus 6 (violett), 10 (blau) und 14 (grau). Die „Hot Spots“ unterhalb von Asp 156 werden durch die Donor-Eigenschaften der  $\alpha$ -NH-Gruppen von Tyr106 und Gly104 sowie der Hydroxylgruppe von Ser103 bzw. der  $\alpha$ -NH-Gruppe und der Hydroxylgruppe von Ser103 erzeugt.

von Ser103. Die Donor-Eigenschaften der  $\alpha$ -NH-Gruppe und der Hydroxylgruppe von Ser103 bestimmen HS 3.

Etwas überraschend ist die starke Präferenz für Carboxylatsauerstoffatome, da die Bindetasche durch Asp102 und Asp158 negativ polarisiert erscheint. Zwar dreht sich die Seitenkette von Asp102 bei pH 5,5 auch in diesen Bereich, doch in diesem Fall wird die negative Ladung des Aspartats vermutlich durch eine positive Ladung des Liganden kompensiert. Die Analyse mit SUPERSTAR zeigt weiter, dass HS 2 und 3 gleichwertig sind. DRUGSCORE hingegen berechnet für HS 3 ein energetisch günstigeres lokales Minimum als für HS 2. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass dieser Bereich schlechter Lösungsmittel zugänglich ist.

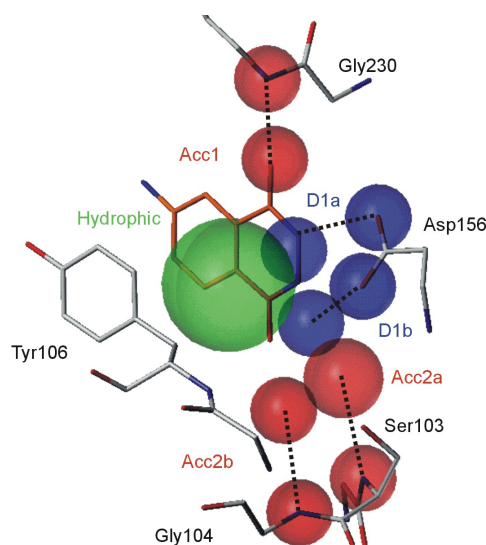
### 3.6.2 Generierung eines Pharmakophor-Modells

Aufbauend auf der „Hot Spot“-Analyse wurde eine Pharmakophor-Hypothese erstellt. Zusätzlich wurden Erkenntnisse aus kristallographisch ermittelten Bindungsmoden von TGT-Inhibitoren einbezogen.

Bisher bekannte affine Liganden gehen eine gegabelte Wasserstoffbrücke zu Asp156, eine Wasserstoffbrücke zu Gly230 und Glu203 sowie entweder eine Wasserstoffbrücke zu Leu231 oder zu einem interstitiellen Wassermolekül, das sich zwischen Ligand und Leu231 befindet, ein. Zusätzlich besitzen sie einen aromatischen Ring, der eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit Tyr106 ausbildet (Kapitel 3.3, [Grädler et al., 2001; Meyer et al., 2002]).

Ein virtuelles Screening nach Verbindungen, die diesen Pharmakophor erfüllen, wurde in Kapitel 3.3 beschrieben. Dabei wurden keine Liganden gefunden, die zusätzlich zu den geforderten funktionellen Gruppen eine Akzeptorgruppe im Bereich der oben beschriebenen „Hot Spots“ 2 und 3 besitzen. Deshalb wurde für das Screening nach Inhibitoren, die eine Akzeptorgruppe in diese Region exponieren, die Pharmakophor-Hypothese des vorangegangenen Screenings weiter gefasst. Anstelle von zwei Wasserstoffbrücken zu Asp156 wurde nur eine dieser Brücken als erforderlich definiert. Der Bereich unterhalb von Asp156 wurde neu in die Pharmakophor-Hypothese aufgenommen. Ein Akzeptor wurde im Bereich des Wassermoleküls W3 (HS 2), das durch die Rotation von Asp102 aus der Bindetasche verdrängt wird (Kapitel 3.5.4), verlangt. Alternativ dazu wurde ein Akzeptor im Bereich des stärker vergrabenen Wassermoleküls W5 (HS 3) gefordert. Um die Direktionalität der Wasserstoffbrücken zu berücksichtigen, wurden

die entsprechenden Gruppen mit den korrespondierenden Akzeptor- bzw. Donorgruppen auf Proteinseite verknüpft (Abb. 3.47). In einem ersten Suchlauf wurde zusätzlich die Wasserstoffbrücke zu Leu231 bzw. zum interstiellen Wassermolekül, wie sie auch im Pharmakophor-Modell aus Kapitel 3.3 enthalten ist (Abb. 3.8 auf Seite 50), berücksichtigt. Damit wurden aber keine interessanten Verbindungen gefunden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde auf die Wechselwirkung zu Leu231 bzw. zum interstitiellen Wassermolekül W1 verzichtet, obwohl bekannt ist, dass diese Wasserstoffbrücke stark zur Affinität der Liganden beiträgt (Kapitel 3.5.1, [Grädler et al., 2001]).



**Abb. 3.47 Struktur-basierte Pharmakophor-Hypothese** (Ligand **4** und Protein sind zur Verdeutlichung mit angegeben). Donorgruppen und die dazugehörigen Akzeptorgruppen auf Proteinseite sind blau, Akzeptorgruppen und die dazugehörigen Donorgruppen auf Proteinseite rot eingefärbt. Die hydrophobe Eigenschaft ist in grün markiert. Die Wechselwirkungen zur Carboxylatgruppe von Asp156 sowie die Akzeptoren Acc2a bzw. Acc2b wurden alternativ verlangt.

### 3.6.3 Virtuelles Screening

Das Screening wurde nach derselben schrittweisen Strategie wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben durchgeführt (siehe auch Kapitel 5.4.5):

1. Die nach Molekulargewicht ( $< 450$  D) und Anzahl der drehbaren Bindungen (max. 7) vorgefilterten Hitlisten wurden vom vorangegangenen Screening übernommen.

2. Die Hitlisten wurden nach Verbindungen durchsucht, die die Mindestanzahl an für den Pharmakophor erforderlichen Gruppen enthalten, also mindestens eine hydrophobe Eigenschaft (einen fünf- oder sechsgliedrigen Ring), zwei Wasserstoffbrücken-Akzeptoren sowie eine Donor.
3. Die in Kapitel 3.6.2 beschriebene 3D-Pharmakophor-Hypothese wurde verwendet.
4. Zusätzlich zum vorangegangenen Schritt wurde die Form der Bindetasche als verbotene Volumenbereiche („excluded volumes“) berücksichtigt.

Die Ergebnisse der einzelnen Filterschritte sind in Tabelle 3.20 zusammengefasst.

Durch die Anwendung der verschiedenen Filterschritte wurde die Anzahl der Verbindungen von über 825.000 auf 620 reduziert. Nach Herausfiltern der mehrfach aufgefundenen Hits verringerte sich die Zahl weiter auf 545 Verbindungen. Unter diesen besaßen nur zwei sowohl Donor **D1a** als auch Donor **D1b** (Abb. 3.47). Eine Carboxylatgruppe als Akzeptor **Acc2a** bzw. **Acc2b** wiesen 88 Verbindungen auf.

Wie beim vorangegangenen Screening wurde die Hitliste visuell inspiziert (Kapitel 3.3.2). Interessante Verbindungen wurden mit FLEXX [Rarey et al., 1996] in eine der beiden bekannten Bindetaschenkonformationen (Abb. 3.10 auf Seite 53) eingepasst. Liganden, die nach dem Docking noch die Pharmakophor-Hypothese erfüllten, wurden mit dem MAB-Kraftfeld [Gerber & Müller, 1995], wie es in MOLOC [Moloc] implementiert ist, im aktiven Zentrum minimiert, wobei die Bindetasche als rigide betrachtet wurde. Die endgültigen Kriterien zur Auswahl der Verbindungen zur Testung auf Inhibition der *Z. mobilis* TGT waren:

- Übereinstimmung mit dem als essentiell angenommenen Wasserstoffbrücken-Netzwerk,
- Komplementarität zwischen Ligand- und Proteinoberfläche,
- Fehlen von ungünstigen van der Waals-Wechselwirkungen nach der Minimierung und
- in der Summe stärkere attraktive als repulsive Coulomb-Wechselwirkungen.

Der letzte Punkt bezieht sich vor allem auf die Anwesenheit einer negativ geladenen Gruppe an den Positionen der Akzeptoreigenschaft **Acc2a** oder **Acc2b**. Die Bindetasche der TGT ist durch drei Aspartate (102, 156 und 280), die relativ nahe beieinander



Tab. 3.20 Übersicht zur Anwendung der hierarchischen Filterschritte auf sieben kommerzielle Molekül-Datenbanken

Filterschritt	ACD		AMBINTER		AEPG		AEGC	
	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]
1. Drehbare Bindungen / MW 2. Erforderliche Mindestanzahl an hydrophoben, Donor- und Akzeptor-Eigenschaften 3. Pharmakophor-Hypothese 3.1 Zeitlimit-Überschreitung 4. Sterische Information der Bindetasche 4.1 Zeitlimit-Überschreitung	215.212	100,00	114.855	100,00	44.549	100,00	182.485	100,00
	135.502	62,96	59.580	52,87	9.417	21,14	91.677	50,24
	57.359	26,65	25.969	22,61	7.718	17,32	65.381	35,83
	7.428	3,45	4.380	3,81	1.373	3,08	12.032	6,59
	391	0,18	1.594	1,39	121	0,27	659	0,36
	194	0,09	63	0,05	14	0,03	147	0,08
	1.651	0,77	2.541	2,21	318	0,71	2.460	1,35

Fortsetzung Tabelle 3.20

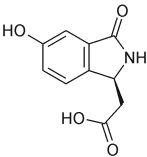
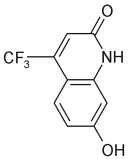
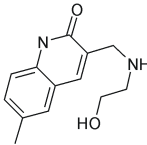
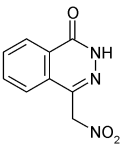
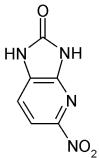
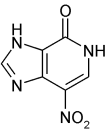
Filterschritt	ChemStar		IBS		LeadQuest		$\sum$	
	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]	Anzahl der Verbindungen	[%]
1. 2. 3. 3.1. 4. 4.1.	57.927	100,00	158.942	100,00	52.002	100,00	825.992	100,00
	28.712	49,57	76.321	48,02	18.231	35,04	419.440	50,78
	19.137	33,04	53.877	33,90	12.564	24,15	242.005	29,30
	3.490	6,02	8.209	5,16	2.168	4,17	39.080	4,73
	193	0,33	2.020	1,27	153	0,29	5.131	0,62
	58	0,10	125	0,08	19	0,04	620	0,08
	646	1,12	2.953	1,86	640	1,23	11.209	1,36

liegen, stark negativ polarisiert. Minimierungen des Bindungsmodus von potenziellen Testkandidaten in MOLOC ergab für Carboxylatgruppen tragende Verbindung fast immer stärkere abstoßende als anziehende Coulomb-Wechselwirkungen.

### 3.6.4 Testung auf Inhibition

Sechs Verbindungen wurden zur Testung auf Inhibition ausgewählt (Tabelle 3.21).

**Tab. 3.21** Liste der sechs Verbindungen, die mittels virtuellen Screenings entdeckt und anschließend auf Inhibition der TGT getestet wurden.

Nr.	Verbindung	Datenbank	Label	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
68		AEGC	BAS 0226423	$403 \pm 33$
69		IBS	STOCK2S-03350	$158 \pm 17$
70		AEPC	ASN 2618148	$58 \pm 15$
71		AEGC / IBS	BAS 0890392 / STOCK1S-52986	$31 \pm 5$
72		ACD / AEGC / IBS	MFCD00184169 / BAS 0853729 / STOCK1S-08826	$27 \pm 3$
73		IBS	STOCK1N-04512	$15,1 \pm 0,1$

Es wurde versucht, durch Eindiffundieren der Liganden in Kristalle bei verschiedenen Temperaturen sowie durch Kokristallisation eine für die Kristallstrukturanalyse ausreichende Population der Liganden in der Bindetasche zu erhalten (Tab. 3.22). Leider waren alle Versuche erfolglos. Zur Diskussion der Hits wird deshalb auf die von FLEXX auf Rang 1 vorgeschlagene Dockinglösungen zurückgegriffen.

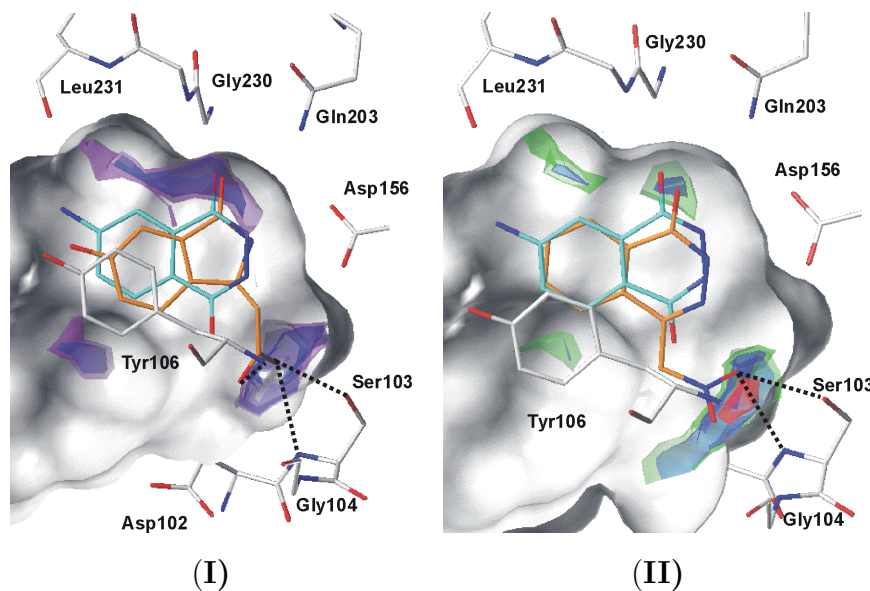
**Tab. 3.22** „Soaking“- und Kokristallisationsversuche mit den Screening-Hits aus Tab. 3.21. (× = versucht, - = nicht versucht.

Ver- bindung	„Soaking“ (pH 8,5)	„Soaking“ (pH 5,5)	Kokristalli- sation (pH 8,5)	„Soaking“ (pH 8,5, 40-50 °C)	Löslich- keit [mM] <sup>*)</sup>
<b>68</b>	×	-	-	-	-
<b>69</b>	×	-	-	-	-
<b>70</b>	×	-	Ligand kristallisiert	×	< 5
<b>71</b>	×	×	×	×	< 2.5
<b>72</b>	×	×	×	×	< 2.5
<b>73</b>	×	-	×	×	< 1.5

<sup>\*)</sup> in der „Soaking“-Lösung bei pH 8,5 und 22 °C

Die einzige ausgewählte Verbindung, die eine negativ geladene Gruppe als Akzeptor Acc2a bzw. Acc2b trägt, ist **68**. Mit ca. 400  $\mu\text{M}$  ist sie zugleich die Verbindung mit dem höchsten  $K_i$ -Wert. Die Dockinglösung auf Rang 1 im Vergleich zum kristallographisch bestimmten Bindungsmodus von **4** (Tab. 2.2 auf Seite 25) ist in Abb. 3.48.I gezeigt. Die Carbonylgruppe von **68** kann eine Wasserstoffbrücke zu Gly230 und die Amidgruppe eine zu Asp156 eingehen. Beide Wechselwirkungen bildet auch **4** aus. Diese Verbindung geht zusätzlich ein zweite Wasserstoffbrücke zu Asp156 sowie eine weitere zu Leu231 ein. Verbindung **68** hingegen kann mit der Carboxylatgruppe zwei Wasserstoffbrücken zu Rückgrat-Amid-Gruppen (Tyr106, Ser103) sowie eine zur Hydroxylgruppe von Ser103 eingehen. Verbindung **6** (Tab. 2.2 auf Seite 25), die vermutlich einen vergleichbaren Bindungsmodus wie **4** ausbildet, kann wie **68** ebenfalls nur eine einfache Wasserstoffbrücke zu Asp156 eingehen. Der  $K_i$ -Wert dieser Verbindung liegt mit  $4,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$  im selben Bereich wie der von **4** ( $8,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ). Es ist bekannt, dass die Wasserstoffbrücke zu Leu231 einen großen Beitrag ( $> \text{Faktor } 10$ ) zur Affinität der Verbindungen liefert (Grädler et al. [2001], Kapitel 3.5.1 und 3.5.6). Vergleicht man die Affinität von Verbindung **68** mit der von **6**, so wird deutlich, dass die zusätzlichen Wech-

selwirkungen, die die Carboxylatgruppe eingeht, den Wegfall der Wasserstoffbrücke zu Leu231 keinesfalls kompensieren können. Der beobachtete Affinitätsverlust ist möglicherweise auf die Anhäufung mehrerer negativ geladener Carboxylatgruppen (Asp156, Asp280, Asp102) zurückzuführen. Somit scheint es energetisch ungünstig, eine weitere negativ geladene Gruppe in diesen Bereich zu platzieren.

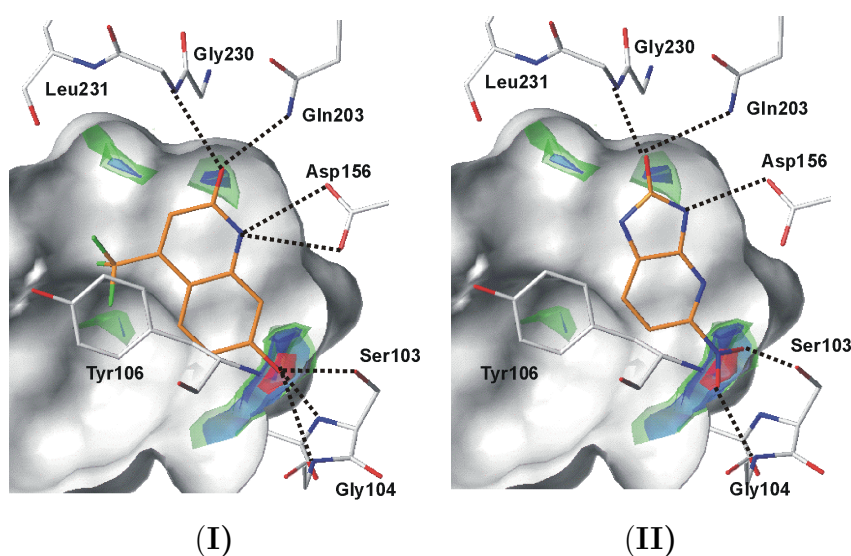


**Abb. 3.48 Dockinglösungen (Rang 1, orange) von 68 (I) und 71 (II) überlagert mit dem kristallographisch bestimmten Bindungsmodus von 4 (grünblau).** (I) O.co2-DRUGSCORE-„Hot Spots“ (konturiert auf 80 (violett), 83 (blau) und 90 % (grau)) (II) O.2-DRUGSCORE-„Hot Spots“ (konturiert auf 80 (grün), 84 (blau) und 92 % (rot)). Im vorgeschlagenen Bindungsmodus bilden beide Liganden Wasserstoffbrücken zu Ser103 und Gly104 aus.

Die Dockinglösung (Rang 1) von **71** ist in Abb. 3.48.II dargestellt. Die Verbindung besitzt eine Nitrogruppe im Bereich der Akzeptoren Acc2a und Acc2b. Sie kann mit ihren funktionellen Gruppen ein sehr ähnliches Wasserstoffbrücken-Netz wie **68** ausbilden. Auch diese Verbindung kann keine Wasserstoffbrücke zu Leu231 eingehen. Im Vergleich zu Verbindung **4**, die eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zu Asp156 sowie die wichtige Wasserstoffbrücke zu Leu231 eingeht, ist ihre Affinität nur um Faktor 3,6 reduziert (31  $\mu$ M). Im Gegensatz zur Carboxylatgruppe von **68** scheint sich die Nitrogruppe von **71** günstig auf die Affinität auszuwirken. In Analogie zu den Verbindungen **51** und **52** (Tab. 3.13 auf Seite 83) kann spekuliert werden, dass durch zusätzliche Einführung einer exocyclischen NH<sub>2</sub>Gruppe, die mit Leu231 wechselwirken kann, die Affinität von **71** gesteigert werden kann.

Die Dockinglösungen (Rang 1) für die Verbindungen **69** und **72** sind in Abb. 3.49 gezeigt. Im Vergleich zu den bisher bekannten Bindungsmoden von TGT-Liganden liegen sie in Bezug auf ihre Längsachse um 90° gedreht in der Bindetasche (Abb. 3.50). Dadurch wird der in der gewählten Ansicht rechte Teil der Bindetasche komplett ausgefüllt.

Verbindung **69** hat einen  $K_i$ -Wert von 158  $\mu\text{M}$ . Viel versprechend ist Verbindung **72** mit einem  $K_i$ -Wert von 27  $\mu\text{M}$ . Diese Verbindung besitzt das Potenzial zur Leitstruktur einer ganz neuen Verbindungsklasse. Durch Substituenten in o- und m-Position zur Nitrogruppe sowie am N1 kann die Bindetasche weiter ausgefüllt werden.

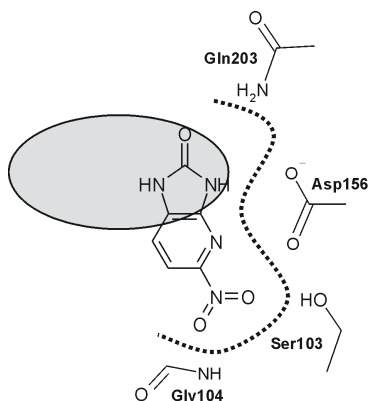


**Abb. 3.49 Dockinglösungen (Rang 1) von 69 (I) und 72 (II).** O.2-DRUGSCORE-„Hot Spots“ (konturiert auf 80 (grün), 84 (blau) und 92 % (rot)). Im vorgeschlagenen Bindungsmodus bilden beide Liganden Wasserstoffbrücken zu Gly230, Gln203, Asp156, Ser103 und Gly104 aus.

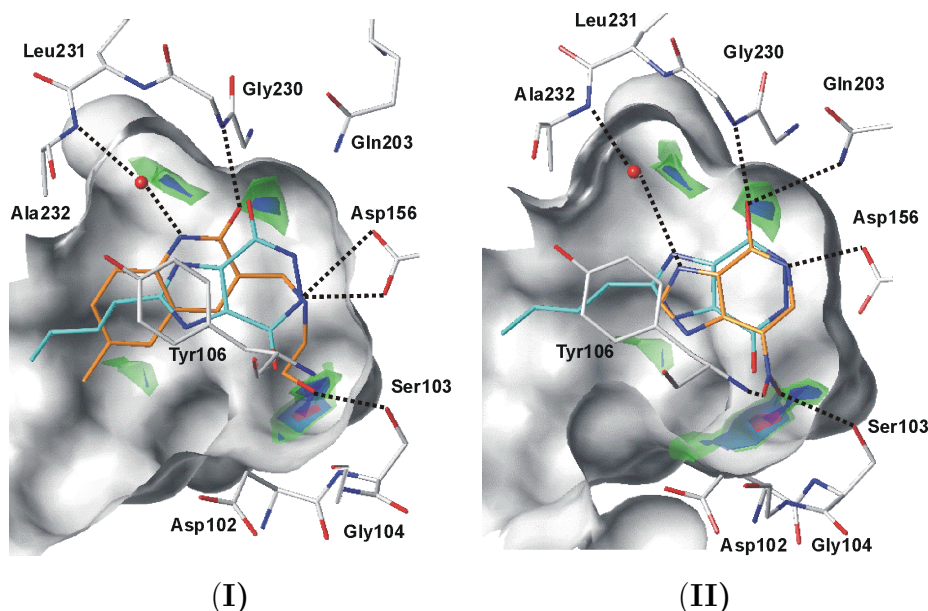
Eine Überlagerung der Dockinglösungen von **70** bzw. **73** mit der Kristallstruktur von TGT-**18** (Kapitel 3.3) zeigt, dass beide Liganden möglicherweise eine über Wasser vermittelte Wechselwirkung zu Leu231 eingehen (Abb. 3.51).

Verbindung **70** kann in dem von FLEXX vorgeschlagenen Bindungsmodus keine Wasserstoffbrücke zur endständigen  $\text{NH}_2$ -Gruppe von Gln203 eingehen. Sie ist der erste bekannte TGT-Inhibitor, der vermutlich eine aliphatische Aminogruppe als Donor zu Asp156 exponiert.

Ligand **73** ist mit einem  $K_i$ -Wert von  $15,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$  die affinste Verbindung, die in diesem Screening-Lauf gefunden wurde. Sie gehört zur Stoffklasse der Dihydroimidazopyridine. Im Gegensatz zu **19**, ein Dihydroimidazopyridazin (Tab. 3.5 auf Seite 46),



**Abb. 3.50 Schematisch dargestellter Bindungsmodus von 72.** Im Vergleich zu den bisher bekannten Bindungsmoden von TGT-Liganden (grau angedeutet) liegen sie in Bezug auf ihre Längsachse um 90° gedreht in der Bindetasche. Dadurch wird der in der gewählten Ansicht rechte Teil der Bindetasche komplett ausgefüllt.



**Abb. 3.51 Dockinglösungen (Rang 1, orange) von 70 (I) und 73 (II) überlagert mit dem kristallographisch bestimmten Bindungsmodus von 18 (grünblau).** O.2-DRUGSCORE-„Hot Spots“ (konturiert auf 80 (grün), 84 (blau) und 92 % (rot)). Beide Liganden können potenziell eine über ein Wassermolekül verbrückte Wechselwirkung zu Leu231 eingehen.

kann sie nur eine einfache Wasserstoffbrücke zu Asp156 eingehen. Dafür ermöglicht ihre Nitrogruppe eine Wechselwirkung mit Ser103 und Tyr106. Im Vergleich zu **19** ist ihre Affinität um mehr als das 10fache gesteigert. Verbindung **18** ist das Butyl-Analogue von Verbindung **19** (Tab. 3.5). Die zusätzliche Butylgruppe steigert die Affinität von **18** im

Vergleich zu **19** um mehr als den Faktor 2. Es kann deshalb spekuliert werden, dass eine solche Gruppe ebenfalls die Affinität von **73** erhöhen sollte.

### Ähnlichkeit der Liganden zu bereits bekannten Inhibitoren

Zur Beurteilung der Ähnlichkeit der Liganden zu bereits bekannten Inhibitoren wurde der Tanimoto-Index (skaliert auf Werte zwischen 0 und 1) berechnet [Dean, 1995; Downs & Willett, 1996]. Als Referenz wurden **4** und **18** verwendet. Die Werte sind in Tab. 3.23 aufgeführt. Mit Ausnahme von Verbindung **68** und **71** im Vergleich zu **4** sind die Tanimoto-Indices jeweils kleiner als 0,3. Die neuen Inhibitoren sind demnach im Rahmen dieser Ähnlichkeitsmatrix als sehr unähnlich zu den bereits bekannten Verbindungen zu bezeichnen.

**Tab. 3.23** Tanimoto-Index der neuen Inhibitoren im Vergleich zu zwei bereits bekannten Liganden (Formeln siehe Tab. 3.21)

Nr.	Tanimoto-Index zu 4	Tanimoto-Index zu 18
<b>68</b>	0,39	0,21
<b>69</b>	0,27	0,22
<b>70</b>	0,29	0,24
<b>71</b>	0,45	0,24
<b>72</b>	0,22	0,23
<b>73</b>	0,19	0,29

### 3.6.5 Schlussfolgerungen

Die Kristallstrukturanalyse von Chinazolinon-TGT-Komplexen hat gezeigt, dass bei bestimmten Liganden bzw. bei pH 5,5 die Seitenkette von Asp102 sich zum Liganden hinorientiert (Kapitel 3.5). Dabei werden zwei Wassermoleküle aus der Bindetasche verdrängt (Abb. 3.36). Eine „Hot Spot“-Analyse dieses Bereichs hat gezeigt, dass eines dieser Wassermoleküle (W3) in einem als günstig für Akzeptoren charakterisieren Bereich liegt (Abb. 3.45.II). Ein weiteres Wassermolekül (W5) in direkter Nachbarschaft dazu befindet sich ebenfalls im Zentrum eines „Hot Spots“ für Akzeptoreigenschaften. Mittels eines zusammengesetzten Pharmakophors wurden verschiedene Datenbanken

nach Verbindungen, die einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor zur Verdrängung dieser Wassermoleküle besitzen, durchsucht.

Sechs Verbindungen wurden zur Messung der  $K_i$ -Werte ausgewählt. Alle Verbindungen waren im mikromolaren Bereich aktiv. Die neuen Verbindungen sind auf Grund des Tanimoto-Ähnlichkeits-Index als sehr unähnlich im Vergleich zu bereits bekannten Inhibitoren zu bezeichnen.

Manche Verbindungen besitzen das Potenzial zur weiteren Optimierung und können somit als neue Leitstrukturen gelten.

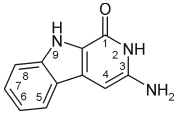
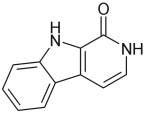
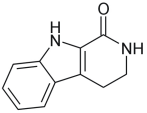


## 3.7 $\beta$ -Carbolinone als Inhibitoren der TGT

*Alle in diesem Kapitel vorgestellten Verbindungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Bracher, LMU München, synthetisiert.*

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Bracher, LMU München, werden  $\beta$ -Carbolinone auf ihre antimikrobielle Wirkung untersucht [Bracher & Hildebrand, 1992, 1993a,b, 1994, 1996; Bracher et al., 1994; Bracher & Daab, 1995]. Einige der dabei verwendeten Grundkörper sind in Tab. 3.24 aufgeführt.

**Tab. 3.24** Grundkörper der in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Bracher synthetisierten  $\beta$ -Carbolinone.

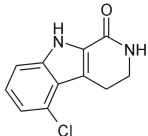
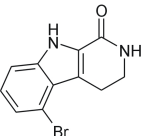
Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu$ M ]
<b>74</b>		$19,2 \pm 2,2$
<b>75</b>		$49 \pm 9$
<b>76</b>		$84 \pm 6$

Verbindung **74** erfüllt das in Kapitel 3.3.1 (Abb. 3.8 auf Seite 50) beschriebenen Pharmakophor-Modell für TGT-Inhibitoren. Sie kann potenziell eine gegabelte Wasserstoffbrücke zu Asp156 sowie Wasserstoffbrücken zu Gln203, Gly230 und zum Wassermolekül W1 eingehen. Verbindung **75** unterscheidet sich von **74** durch den Wegfall der exocyclischen Aminogruppe, die wahrscheinlich mit Asp156 wechselwirkt. In Verbindung **76** weicht im Gegensatz zu **75** der Pyridinonring von einer planaren Geometrie ab. Durch den Wegfall der Aminogruppe erfüllen beide Verbindungen nicht die Anforderungen des Pharmakophor-Modells. Allerdings wurde für ein weiteres virtuelles Screening ein abgewandelter Pharmakophor definiert (Kapitel 3.6.2, Abb. 3.47 auf Seite 121). In diesem Pharmakophor-Modell wird nur eine Wasserstoffbrücke zu Asp156 verlangt, dafür aber zusätzliche Wasserstoffbrücken zu Ser103 oder Gly104. Auf die

Wasserstoffbrücke zu Leu231 bzw. dem interstitiellen Wassermolekül W1 wurde hingegen verzichtet. Die Verbindungen **75** und **76** erfüllen eine Kombination aus beiden Pharmakophor-Modellen. Sie können potenziell, wie im zweiten Modell verlangt, nur eine einfache Wasserstoffbrücke zu Asp156 eingehen. Wasserstoffbrücken zu Ser103 und Gly104 sind zwar nicht möglich, dafür können aber Wasserstoffbrücken zum Wassermolekül W1, das den Kontakt zu Leu231 vermittelt, ausgebildet werden. Diese Wechselwirkung wird im erst genannten Pharmakophor-Modell gefordert. Deshalb könnten auch diese beiden Verbindungen TGT-Inhibition darstellen.

Erwartungsgemäß besitzt Verbindung (**74**), die eine gegabelte Wasserstoffbrücke zu Asp156 eingehen kann, die höchste Affinität in dieser Serie. Mit einem  $K_i$ -Wert von  $19,2 \mu\text{M}$  liegt ihre Bindungsenergie bereits in einem Bereich, der für eine weitere Optimierung eine gute Ausgangslage bietet. Der Wegfall einer Wasserstoffbrücke zu Asp156 (**75**) hat aber keinen dramatischen Einfluss auf den  $K_i$ -Wert dieser Verbindung. Mit  $49 \mu\text{M}$  ist er nur um den Faktor 2,6 im Vergleich zu jenem von **74** erhöht. Auch Verbindung **75** ist deshalb für eine weitere Optimierung geeignet. Ist der Pyridinonring durch Hydrierung partiell gefaltet (**76**), so erhöht sich der  $K_i$ -Wert weiter auf  $84 \mu\text{M}$ .

Tab. 3.25 Halogen-Derivate der  $\beta$ -Carbolinone für „Soaking“-Versuche.

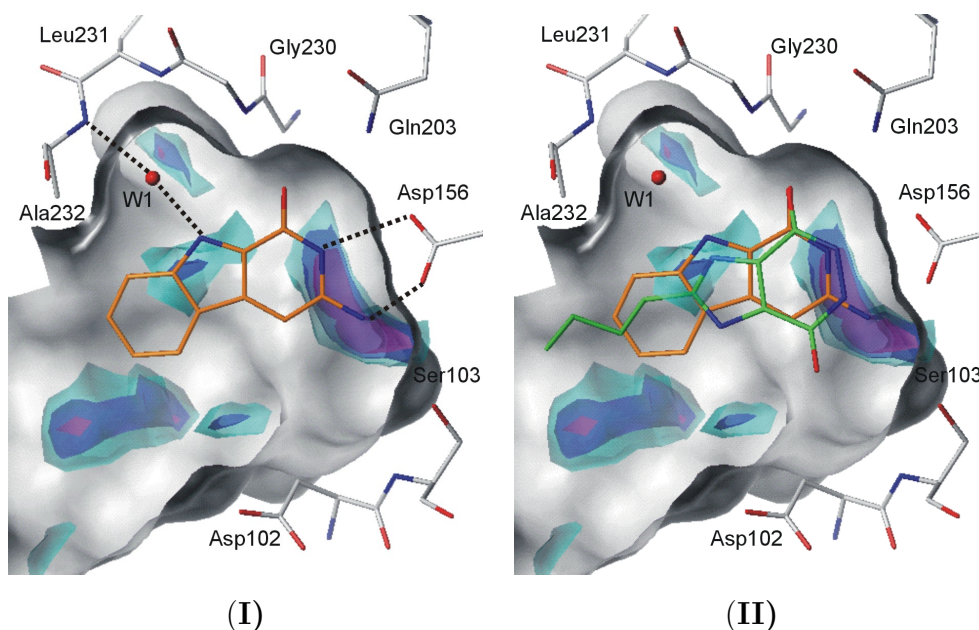
Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>77</b>		$46 \pm 4$
<b>78</b>		$28 \pm 9$

Es wurde versucht, die Verbindungen **74** - **76**, das Hydrochlorid von **74** sowie zwei weitere Derivate, die zusätzlich ein Halogen enthalten (Tab. 3.25), in *Z. mobilis* TGT-Kristalle eindiffundieren zu lassen. Diese elektronenreichen Substituenten wurden ausgewählt, um im Falle eines erfolgreichen „Soakings“ die Bindungsmoden der Liganden selbst bei partieller Population noch anhand der angedeuteten Elektronendichte erfolgreich interpretieren zu können.

Leider waren aller „Soaking“-Versuche erfolglos. Höchstwahrscheinlich lässt sich dies auf eine zu geringe Wasserlöslichkeit der untersuchten  $\beta$ -Carbolinone zurückführen. Allerdings konnte durch die Halogenierung die Affinität des Grundkörpers (**76**) gesteigert werden. Der  $K_i$ -Wert des Chlor-Derivats (**77**) liegt mit  $46\ \mu\text{M}$  bereits im Bereich des  $K_i$ -Wertes von **75**, der des Brom-Derivats (**78**) mit  $28\ \mu\text{M}$  zwischen jenem von **74** und **75**.

Da keine Kristallstruktur der Liganden im Komplex mit TGT erhalten werden konnte, wurde der Bindungsmodus von **74** basierend auf der Kristallstruktur von TGT·**18** (Abb. 3.6 auf Seite 47) mit MOLOC [Moloc] modelliert (Abb. 3.52.I). Genau wie **18** kann **74** eine gegabelte Wasserstoffbrücke zu Asp156 sowie Wasserstoffbrücken zu Gln203, Gly230 und zum Wassermolekül W1 eingehen. Im angenommenen Bindungsmodus liegen die Wasserstoffbrücken-Donoren von **74** in den mit einer Wasserstoffbrücken-Donor-Sonde (N.3) berechneten „Hot Spots“ (Kapitel 5.4.1.2).

Für die Verbindungen **75** und **76** kann ein analoger Bindungsmodus mit nur einer Wasserstoffbrücke zu Asp156 postuliert werden.



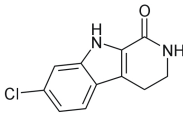
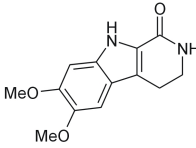
**Abb. 3.52** (I) Modellierter Bindungsmodus von **74**. Die Donorgruppen der Verbindung liegen in für Wasserstoffbrücken-Donoren als günstig vorhergesagten Bereichen. (Berechnet mit DRUGSCORE (N.3-Sonde), konturiert auf 80 (grünblau), 84 (blau) und 88 % (violett).) (II) Überlagerung der Kristallstruktur von TGT·**18** (grün) und dem modellierten Bindungsmodus von **74** (orange). Ein Teil der Butylgruppe von **18** ragt in einen Bereich der Bindetasche, der von **74** nicht adressiert wird.

Ein plausibler Bindungsmodus,  $K_i$ -Werte im zweistelligen mikromolaren Bereich sowie etablierte Synthesewege von  $\beta$ -Carbolinonen im Arbeitskreis von Prof. Dr. F. Bracher machen diese Stoffe zu interessanten Ausgangsverbindungen für eine weitere Optimierung auf TGT-Inhibition.

### 3.7.1 $\beta$ -Carbolinone mit Substituenten in der 7-Position

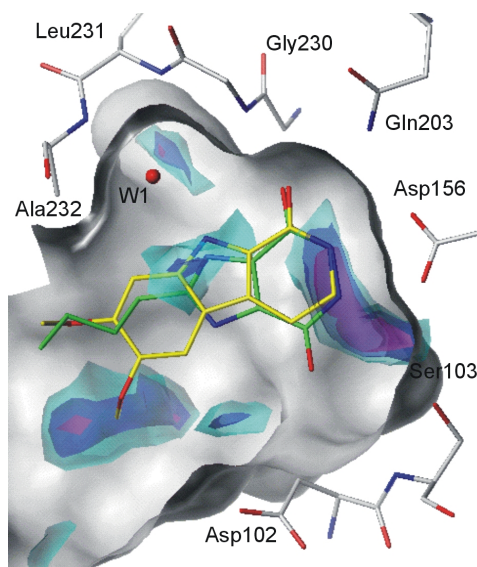
Eine Überlagerung des modellierten Bindungsmodus von **74** und des kristallographisch bestimmten von **18** in der Bindetasche der *Z. mobilis* TGT zeigt, dass **18** einen Bereich in der Bindetasche ausfüllt, der durch einen Substituenten in der 7-Position des  $\beta$ -Carbolinon-Gerüsts adressiert werden kann (Abb. 3.52.II). Die Butylgruppe von **18** hat die Affinität dieser Verbindung im Vergleich zu **19** (wie **18**, aber ohne Butylgruppe) um mehr als das Doppelte gesteigert (Tab. 3.5 auf Seite 46). Deshalb wurde versucht, durch geeignete Substituenten in der 7-Position der  $\beta$ -Carbolinon-Grundkörper deren Affinität ebenfalls zu verbessern. Dazu wurde auf bereits in der Gruppe von Prof. Bracher vorhandene Verbindungen zurückgegriffen (Tab 3.26).

**Tab. 3.26**  $\beta$ -Carbolinone mit Substituenten in der 7-Position.

Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu$ M ]
<b>79</b>		$141 \pm 30$
<b>80</b>		$3,8 \pm 0,5$

Ein Chlor-Substituent in der 7-Position (**79**) konnte die Affinität nicht steigern. Die Verbindung **80** mit je einer Methoxygruppe in der 6- und 7-Position brachte hingegen eine Affinitätssteigerung um mehr als Faktor 30 im Vergleich zum unsubstituierten Grundkörper **76**. Der  $K_i$ -Wert beträgt bereits  $3,8 \mu$ M. Auch von dieser Verbindung konnte leider keine Röntgenstruktur erhalten werden. Der modellierte Bindungsmodus von **80** im Vergleich zum kristallographisch bestimmten von **18** zeigt, dass die Methoxygruppe in der 7-Position vermutlich in denselben Teil der Bindetasche hineinragt, den

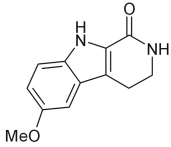
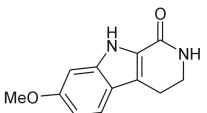
auch die Butylkette von **18** ausfüllt (Abb. 3.53). Zusätzlich zu diesem Rest enthält die Verbindung noch eine zweite Methoxygruppe in der 6-Position. Beide Methoxygruppen gehen vermutlich keine Wasserstoffbrücken zum Protein ein.



**Abb. 3.53** Überlagerung der Kristallstruktur von TGT-18 (grün) und dem modellierten Bindungsmodus von **80** (gelb). Die Donorgruppen der Verbindung liegen in für Wasserstoffbrücken-Donoren als günstig vorhergesagten Bereichen. (Berechnet mit DRUG-SCORE (N.3-Sonde), konturiert auf 80 (grünblau), 84 (blau) und 88 % (violett).) Die Methoxygruppe in der 7-Position von **80** ragt in einen Bereich der Bindetasche, der auch von **18** adressiert wird.

Um zu untersuchen, welche der beiden Methoxygruppen für die Affinitätssteigerung verantwortlich ist, wurden die analogen Verbindungen mit jeweils nur einer Methoxygruppe synthetisiert. (Tab. 3.27).

**Tab. 3.27** Derivate von **80**, die jeweils nur eine Methoxygruppe besitzen.

Nr.	Verbindung	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>81</b>		$9,8 \pm 1,1$
<b>82</b>		$2,7 \pm 0,6$

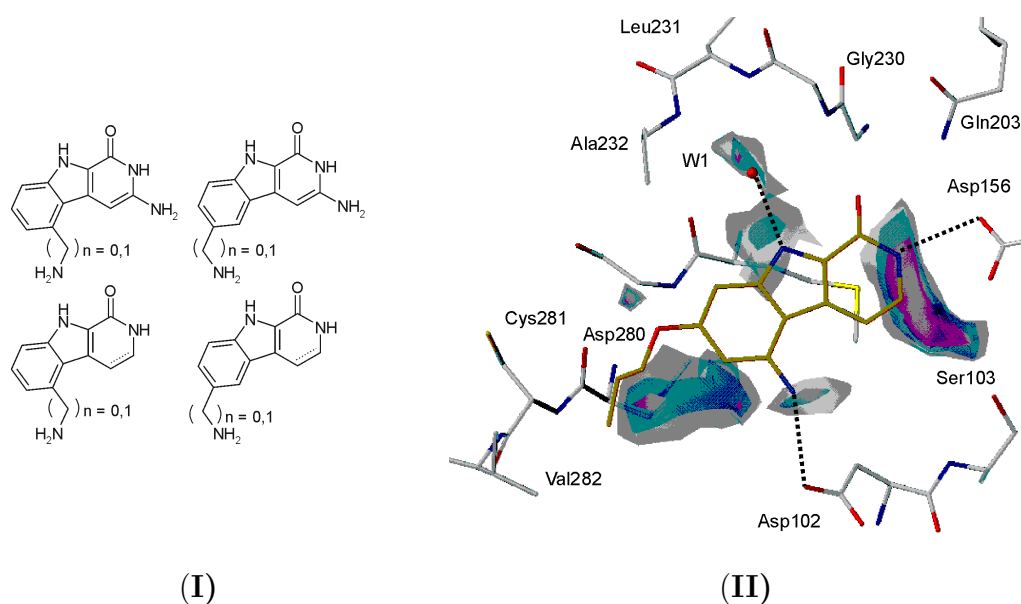
Beide Verbindungen sind affiner als der Grundkörper **76**. Der  $K_i$ -Wert von Verbindung **81**, (Methoxygruppe in 6-Position) ist im Vergleich zu dem von **80** (zwei Methoxygruppen) um das 2,5fache erhöht ( $K_i = 9,8 \mu\text{M}$ ). Der  $K_i$ -Wert von Verbindung **82** (Methoxygruppe in 7-Position) ist im Vergleich zu dem von **80** jedoch mit  $2,7 \mu\text{M}$  leicht erniedrigt.

Sowohl die 6- als auch 7-Position der  $\beta$ -Carbolinone sind demnach geeignet, um die Affinität der Grundkörper durch geeignete Substituenten zu steigern. Eine Methoxygruppe in 7-Position bringt hier eine größere Steigerung als in eine in 6-Position.

### 3.7.2 Vorschläge zur weiteren Optimierung der $\beta$ -Carbolinone

Die hier vorgestellten  $\beta$ -Carbolinone bilden vermutlich alle mit dem N3-Stickstoff eine Wasserstoffbrücke zu Asp156 aus (Abb. 3.52.I). Die Grundkörper **74** und **75** unterscheiden sich durch eine exocyclische Aminogruppe, die nur in **74** vorhanden ist. Durch die zusätzliche zweite Wasserstoffbrücke von **74** zu Asp156 dürfte die ideale Bindungsgeometrie dieses Liganden fest in der Bindetasche fixiert sein. Dieses Phänomen wurde bereits bei Liganden des Chinazolin-4-on-Typen beobachtet (Kapitel 3.5.6). Dort wurde die dem Aromaten direkt benachbarte Aminogruppe von **56** gegen eine über eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe vom Aromaten abgekoppelte Aminogruppe ersetzt (**66**, Tab. 3.17 auf Seite 104). Die erhöhte Basizität dieser Gruppe in **66** sollte zu einer stärkeren Wasserstoffbrücke mit Leu231 führen. Dafür müsste der Ligand aber seine Bindungsgeometrie in Bezug auf Asp156 leicht ändern. Die Kristallstrukturanalyse von **66** hat gezeigt, dass dies jedoch nicht der Fall ist. Offensichtlich ist die gegabelte Wasserstoffbrücke zu Asp156 so stark, dass ein leichtes Herausdrehen aus der optimalen Lage nicht möglich ist (Abb. 3.42 auf Seite 111). Die vermutlich weniger starre Fixierung von **75** und **76** könnte den Vorteil haben, dass eine leichte Veränderung der Bindungsgeometrie, wie sie durch das Anbringen von Substituenten hervorgerufen werden kann [Grädler et al., 2001], besser toleriert wird. Dies könnte den Nachteil aufwiegen, dass die  $K_i$ -Wert dieser beiden Verbindungen im Vergleich zu dem von **74** erhöht sind. Des Weiteren wurde mit den Verbindung **80** - **82** bereits gezeigt, dass selbst mit dem am wenigsten affinen Grundkörper **76** durch eine Dekoration mit geeigneten Substituenten Affinitäten im unteren mikromolaren Bereich erreicht werden können. Deshalb sollten zur Optimierung alle Grundkörper weiter verfolgt werden.

Die Affinität von **76** wurde durch eine Methoxygruppe in 6- und / oder 7-Position gesteigert (**80** - **82**), wobei die größte Steigerung durch eine Methoxygruppe in 7-Position erreicht wurde. In diesem Bereich der Bindetasche der TGT befindet sich eine lipophile Tasche, die von Cys281 und Val282 gebildet wird. Durch eine Verlängerung der Methoxygruppe zu einer Ethoxy- oder Propoxygruppe kann diese Region noch besser ausgefüllt werden (Abb. 3.54.II).



**Abb. 3.54** Derivate der  $\beta$ -Carbolinone, die möglicherweise eine gesteigerte Affinität im Vergleich zum Grundkörper haben. (I) Die zusätzliche exocyclische Aminogruppe kann potenziell mit Asp280 bzw. Asp102 wechselwirken. (II) Die Wasserstoffbrücken-Donoren des potenziellen TGT-Inhibitors liegen in als günstig für Donoren vorhergesagten Bereichen. (Berechnet mit DrugScore (N.3-Sonde), konturiert auf 80 (grünblau), 84 (blau) und 88 % (violett).) Die Propoxygruppe kann zusätzlich die lipophile Tasche, die durch Cys281 und Val282 gebildet wird, ausfüllen.

Eine „Hot Spot“-Analyse der Bindetasche zeigt günstige Wechselwirkungsfelder für eine Donor-Sonde im Bereich von Asp102 sowie Asp280 (Abb. 3.52.I). Wie schon bei der Optimierung der Dihydropyridazinochinolintrione und Pterine versucht (Kapitel 3.4) sollte auch hier angestrebt werden, diese Bereiche durch geeignete Substituenten zu adressieren.

Modellierungen mit MOLOC [Moloc] und SYBYL [SYBYL] haben ergeben, dass mit einer Amino- sowie Aminomethyl-Gruppe in der 5- und 6-Position die „Hot Spots“ im Bereich von Asp102 und Asp280 erreicht werden können. Die entsprechenden Verbindungen sind in Abb. 3.54 gezeigt. Die basische Aminomethyl-Gruppe könnte zusätzlich den Vorteil haben, dass die Löslichkeiten der Verbindungen in einen für das „Soaking“

ausreichenden Konzentrationsbereich gelangen könnten. Dieser Effekt wurde bereits für die Aminomethyl-Verbindung **66** (Kapitel 3.5.6) beobachtet.

Durch Methoxygruppen konnte die Affinität von **76** bereits gesteigert werden. Eine Ethoxy- oder Propoxygruppe in 7-Position ist eventuell noch besser geeignet (s.o.). Es bietet sich daher an, die Vorschläge aus Abb. 3.54.I mit einer Substitution in 7-Position zu kombinieren. Ein möglicher Ligand mit dem modellierten Bindungsmodus ist in Abb. 3.54.II gezeigt.



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen Bindungsassay mit der *Z. mobilis* TGT aufzubauen (Kapitel 3.1). Dazu wurden Fluoreszenz- und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-spektroskopische Methoden eingesetzt. In beiden Fällen ist es nicht gelungen, eine Bindung der Liganden an die TGT zu detektieren. Im Falle der Fluoreszenz-Untersuchungen kann das darauf zurückgeführt werden, dass bisher noch kein geeigneter fluoreszenzmarkierter Ligand gefunden wurde. Der hier verwendete Fluorophor Anthranilsäure hat den Vorteil, dass er sehr klein ist und deshalb gut in die Bindetasche der TGT passt. Allerdings überlappt sein Fluoreszenzspektrum zu stark mit dem des verwendeten Chinazolinon-Grundkörpers, so dass keine Fluoreszenzunterschiede nach der Bindung gemessen werden konnten. Im Falle der SPR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der „Linker“ der erforderlich ist, um den Liganden auf einem Chip zu immobilisieren, keinen großen Einfluss auf die Affinität des Liganden hat. Allerdings müssen noch Versuche mit weiteren „Linkern“ durchgeführt werden, um eine Aussage treffen zu können, ob durch SPR-Untersuchungen mit Guanosin-Derivaten eine TGT-Bindung messbar ist.

Des Weiteren wurde in einer Mutationsstudie durch Mutation von Tyr106 zu Phenylalanin aus der Bindetasche der *Z. mobilis* TGT die der *S. flexneri* TGT erhalten (Kapitel 3.2). Die kinetische Charakterisierung dieses mutierten Enzyms hat gezeigt, dass es im Rahmen der Messfehler unverändert zum Wildtyp-Enzym ist. Die Röntgenstrukturanalyse der Y106F-Variante der TGT brachte hervor, dass im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym die Bindetasche in der apo-Struktur geöffnet ist. Dies hat aber keinen Einfluss auf die für die Bestimmung der  $K_i$ -Werte erforderliche Inkubationszeit.

Darüber hinaus sind in der vorliegenden Arbeit verschiedene Design-Zyklen für Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT beschrieben worden.

Aufbauend auf den Erkenntnissen einer vorangegangenen Studie wurden durch ein virtuelles Screening weitere Inhibitoren des Pyridazindion-Typs gefunden (Kapitel 3.3, Tab 3.5 auf Seite 46). Die Kristallstrukturanalyse von einem dieser Liganden (**18**) im Komplex mit *Z. mobilis* TGT zeigte, dass in der Bindetasche überraschenderweise die Peptidbindung zwischen Leu231 und Ala232 umgeklappt ist und ein interstitielles Wassermolekül nun den Kontakt zwischen Ligand und Protein vermittelt. Die Kennt-

nis dieses neuen Bindungsmodus zusammen mit der ambivalenten Donor-Akzeptor-Eigenschaft des Wassermoleküls, eine mögliche Wasserstoffbrücke mit einem Liganden zu bilden, wurde genutzt, um eine strukturbasierte Pharmakophor-Hypothese aufzubauen. Eine Datenbanksuche mit dieser Pharmakophor-Hypothese brachte eine Vielzahl potenzieller TGT-Inhibitoren aus verschiedenen Verbindungsklassen hervor. Von neun dieser Hits wurden  $K_i$ -Werte bestimmt (Tab. 3.7 auf Seite 58). Alle Verbindungen waren im mikromolaren Bereich aktiv, zwei sogar im submikromolaren Bereich. Einige dieser Verbindung besitzen das Potenzial zur weiteren Optimierung und können somit als neue Leitstrukturen dienen.

Die Optimierung von zwei dieser Leitstrukturen wurde in Kapitel 3.4 beschrieben. Bei der Stoffklasse der Dihydropyridazinochinolintrione (Abb. 3.16 auf Seite 64) sind Probleme bei der Synthese aufgetreten. Für die Stoffklasse der Pterine konnte eine geeignete Synthese etabliert werden. Die affinste Verbindung dieser Serie ist im submikromolaren Bereich aktiv (Tab. 3.12 auf Seite 76).

Von Emmanuel Meyer (ETH Zürich) wurden Chinazolinone als TGT-Inhibitoren der TGT entworfen (Abb. 3.26 auf Seite 82). Diese Liganden wurden röntgenstruktur-analytisch im Komplex mit *Z. mobilis* TGT charakterisiert und ihre  $K_i$ -Werte bestimmt (Kapitel 3.5). Der vorgeschlagene Bindungsmodus des Grundkörpers konnte so bestätigt werden. Bei der röntgenstruktur-analytischen Charakterisierung der Komplexe ist aufgefallen, dass die Seitenkette von Asp102 bei bestimmten Liganden bei pH 8,5 und allen Liganden bei pH 5,5 ihre Konformation im Vergleich zur apo-Struktur ändert und sich zum Liganden hindreht (Abb. 3.36 auf Seite 100). Dadurch werden zwei Wassermoleküle aus der Bindetasche verdrängt. Diese Beobachtung war der Anlass, diesen Bereich der Bindetasche mit einer „Hot Spot“-Analyse näher zu untersuchen.

Die „Hot Spot“-Analyse hat ergeben, dass sich eines der verdrängten Wassermoleküle (W4) an einem kaum zugänglichen Bereich in der Bindetasche befindet (Kapitel 3.6). Das zweite Wassermolekül (W3) liegt in einem Bereich, der als günstig für Wasserstoffbrücken-Akzeptoren vorhergesagt wird (Abb. 3.45 auf Seite 118). Benachbart zu diesem Wassermolekül befindet sich ein weiteres (W5), das ebenfalls in einem für Akzeptoren als günstig vorhergesagten Bereich liegt. Mit einem virtuellen Screening wurde nach Verbindungen gesucht, die diese Wassermoleküle verdrängen. Sechs Verbindungen wurden zur Messung der  $K_i$ -Werte ausgewählt (Tab. 3.21 auf Seite 124). Eine Verbindung, die eine Carboxylatgruppe in diese Region der Bindetasche exponiert, war mit ca. 400  $\mu$ M nur schwach aktiv. Drei Verbindungen, die über ihre Nitrogruppen Wasserstoff-

brücken in diesem Bereich ausbilden können, zeigten jedoch Affinitäten im zweistelligen mikromolaren Bereich. Im Rahmen der Tanimoto-Ähnlichkeitsmatrix sind die gefunden Verbindungen als unähnlich zu bereits bekannten Inhibitoren zu bezeichnen. Auch unter diesen Verbindungen befinden sich welche, die als neue Leitstrukturen dienen können.

Eine weitere neue Verbindungsklasse für TGT-Inhibitoren wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. F. Bracher (LMU München) untersucht (Kapitel 3.7). In dieser Arbeitsgruppe werden  $\beta$ -Carbolinone auf Grund ihrer antimikrobiellen Wirkung synthetisiert. Einige der Grundkörper entsprechen den zuvor in dieser Arbeit aufgestellten Pharmakophor-Modellen bzw. einer Kombination aus ihnen (Tab. 3.24 auf Seite 131). Die getesteten Grundkörper sind im zweistelligen mikromolaren Bereich aktiv. Durch Anfügen einer Methoxygruppe konnte der  $K_i$ -Wert einer Verbindung um mehr als das 30fache auf 2,7  $\mu$ M verbessert werden.

Bei den Optimierungsversuchen der in dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen konnte die Affinität der Grundkörper durch Reste, die mit der polaren Aminosäure Asp280 wechselwirken sollten, nicht gesteigert werden (**35** in Tab. 3.8 auf Seite 66, **40** in Tab. 3.12 auf Seite 76, **65** in Tab. 3.17 auf Seite 104). Der Grund hierfür könnte in ungünstigen Torsionswinkeln liegen, die die Verbindungen einnehmen müssten, um mit dieser Aminosäure wechselwirken zu können, in unbefriedigenden Desolvatationsbeiträgen oder daran, dass der  $pK_a$ -Wert von Asp280 aus mechanistischen Gründen eventuell erhöht ist. Geeigneter für die Optimierung ist die lipophile Tasche, die aus Val45, Leu68 und Val282 gebildet wird. In zwei Fällen konnten durch aromatische Reste, die vermutlich in diesen Bereich binden, die Affinitäten der Grundkörper verbessert werden (**49** in Tab. 3.12 auf Seite 76 und **56** in Tab. 3.14 auf Seite 89). Ebenfalls als günstig hat sich der Bereich etwas oberhalb davon unter Einbeziehung von Cys281 gezeigt. Ein viel versprechender Ligand, der mit dem ersten hier vorgestellten Screening gefunden wurde (**30** in Tab. 3.7 auf Seite 58), sowie die Methoxygruppen der  $\beta$ -Carbolinone (**80** in Tab. 3.26 auf Seite 134) binden vermutlich dort.

Vor Beginn dieser Arbeit wurde die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT als sehr rigide angesehen. Die einzige bekannte bewegliche Aminosäure war Gln107. Diese ist im Komplex mit preQ<sub>1</sub> im Gegensatz zu Komplexen mit Pyridazindionen zum Liganden gedreht und geht mit diesem eine wasservermittelte Wasserstoffbrücke ein. Durch die Röntgenstrukturanalyse weitere Komplexe wurden zusätzliche flexible Bereiche gefunden. So wird die Seitenkette von Asp102 bei bestimmten Liganden zu diesem rotiert und

geht mit ihm vermutlich eine ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke ein (Abb. 3.36 auf Seite 100). Es ist anzunehmen, dass eine geeignete Protonierung des Liganden vorliegen muss, was wiederum auf eine richtige Einstellung der  $pK_a$ -Werte an dem verwendeten Molekülbaustein spricht. Durch die Rotation von Asp102 wird das Wasserstoffbrücken-Netzwerk, in das diese Aminosäure zuvor mit Asn70 eingebunden war, gelöst. In Folge der fehlenden Verankerung ist die Seitenkette von Asn70 in diesen Strukturen ungeordnet. Die dramatischste ligandinduzierte Veränderung in der Bindetasche der TGT ist das Umklappen der Peptidbindung zwischen Leu231 und Ala232 (Abb. 3.6 auf Seite 47). Dadurch wird die Carbonylgruppe von Leu231 aus der Bindetasche herausgedreht, und die NH-Gruppe von Ala232 in die Ligandenbindestelle orientiert. Ein interstitielles Wassermolekül vermittelt dann den Kontakt zwischen dem Liganden und der Bindetasche in diesem Bereich.

Interessanterweise nimmt das unkomplexierte Enzym in einer Struktur, die bei pH 5,5 bestimmt wurde, ebenfalls diese Konformation ein. Ein Vergleich mit der Struktur der archaebakteriellen TGT zeigt eine ähnliche Konformation der Hauptkette mit der NH-Gruppe der Peptidbindung in Ausrichtung auf die Bindetasche (Abb. 3.33 auf Seite 95). Prokaryontische TGT und archaebakterielle TGT besitzen unterschiedliche Substratspezifitäten, die offensichtlich mit dieser Konformationsänderung in Einklang stehen. Alle Änderungen wären ohne Kristallstrukturbestimmung nur schwer Vorhersagbar gewesen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Röntgenstrukturanalyse für ein erfolgreiches Wirkstoff-Design.

## 4.2 Ausblick

Um die Bindung neuer Liganden an die *Z. mobilis* TGT kostengünstiger und einfacher messen zu können, ist es weiterhin notwendig, ein alternatives Testsystem zu entwickeln. Auch wenn bisher mit SPR-Untersuchungen keine Bindung gemessen werden konnte, so ist diese Methode doch viel versprechend. Sie ist schnell, sensitiv und nicht so stark störänfällig wie die Fluoreszenzspektroskopie. Durch Immobilisierung von tRNA kann zu dem eventuell untersucht werden, ob die Liganden eine tRNA-Bindung verhindern. Das würde wertvolle Hinweise auf den Enzymmechanismus liefern.

Weiter scheint das Umklappen der Peptidbindung von Leu231 zu Ala232 nach der Bindung bestimmter Liganden sowie bei pH 5,5 in der apo-Struktur in der Substratspezifität eine Rolle zu spielen. Dies geht vermutlich mit einem Wechsel des Protonierungs-

zustands von Glu235 einher. Durch die Mutation Glu235Gln könnte dies überprüft werden.

Die Röntgenstrukturanalyse von Komplexen aus *Z. mobilis* TGT und Liganden hat gezeigt, dass sich die Seitenkette von Asp102 bei pH 5,5 zu Liganden des Chinazolinon-Typs dreht und, unter der Annahme, dass der Ligand unter diesen Bedingungen protoniert vorliegt, eine ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke zu ihm ausbildet. Mit einem virtuellen Screening könnte nun nach Liganden gesucht werden, die unter physiologischen Bedingungen eine geladene Gruppe in diesen Bereich exponieren, so dass Salzbrücken zu Asp102 und dem sich in der Nähe befindenden Asp159 ausgebildet werden können.

Auch bei der Optimierung der Leitstrukturen sollte versucht werden, die Carboxylatgruppe von Asp102 in einer der beiden bekannten Konformationen zu adressieren. Ein geeignetes Grundgerüst dafür ist  $\beta$ -Carbolinon. Entsprechende Vorschläge sind in Kapitel 3.7 gezeigt.

Des Weiteren sollte die viel versprechende Subtasche, die aus Val45, Leu68, Val282 und Cys281 gebildet wird, weiter abgetastet werden.

Bei der Optimierung der Liganden muss berücksichtigt werden, dass durch funktionelle Gruppen die Löslichkeit der Liganden ebenfalls verbessert wird. Bei geeigneter Löslichkeit und Aktivität können die Liganden dann in einem *in vivo*-Assay an Shigellen getestet werden.

Dies alles zusammengekommen kann dazu führen, dem Ziel, ein potentes Antibiotika gegen die Shigellenruhr zu entwickeln, näher zu kommen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien, Enzyme und Säulenmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Seelze), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen. Komplexmedienbestandteile und Agar stammten von Difco (Augsburg). Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Frankfurt), Protease-Inhibitor-Cocktail, Pyrophosphatase, dNTPs und NTPs von Roche Diagnostics (Mannheim) geliefert. Die verwendeten Säulenmaterialien (Q-Sepharose, Phenyl-Sepharose, SOURCE 15 Q) stammte von Amersham Pharmacia Biosciences (Uppsala, Schweden). Radioaktiv markiertes [8-<sup>3</sup>H]-Guaninhydrochlorid (0.5 mCi/ml) wurde von der Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen.

### 5.2 Biochemische Methoden

#### 5.2.1 Medien

Die verwendeten Medien wurden autoklaviert (30 min, 121 °C, 1,3 bar). Zur Herstellung von festen Nährböden wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.

**LB-Medium:** 1,0 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt,  
0.5 % (w/v) NaCl

Antibiotika-Stammlösungen wurden mit einem Filter von 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert. Die verwendeten Antibiotika-Konzentrationen für Medien und Agar waren:

**Ampicillin** (Amp): 100 µg/ml in aqua bidest.  
**Chloramphenicol** (Cm): 10 µg/ml in Ethanol  
**Kanamycin** (Km): 50 µg/ml in aqua bidest.

### 5.2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tab. 5.1, die verwendeten Plasmide in Tab. 5.2 aufgeführt.

**Tab. 5.1 In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.**

Stamm ( <i>E. coli</i> )	Beschreibung	Herkunft
XL2-blue	<i>(mcrA)183(mcrB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proAB laqI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn5(Km<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene (Heidelberg)
BL21(DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)galλ(DE3)</i> [pLys Km <sup>r</sup> ]	Stratagene (Heidelberg)
BL21/ pAR1219	F <sup>-</sup> <i>dcm ompT<sup>-</sup> hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)galλ(DE3)</i>	[Davanloo et al., 1984]

**Tab. 5.2 In dieser Arbeit verwendete Plasmide.**

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pET9d-ZM4	Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; ColEI-origin, <i>tac</i> -Promotor, kodiert für <i>laqI<sup>q</sup>malE lacZα</i> ; enthält <i>tgt</i> als 1,3 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Nco</i> I-Fragment in pET9d	[Reuter & Ficner, 1995]
pET9d-ZM4- Y106F	Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; Tyr-106-Phe Mutante der TGT	diese Arbeit
pAR1219	Amp <sup>r</sup> ; <i>lacI</i> - und <i>lacUV5</i> - Promotor, enthält <i>T7 RNA Polymerase</i> als 4,44 kb Fragment in pBR322	[Davanloo et al., 1984]
ptRNA2	Amp <sup>r</sup> ; enthält T7-Promotor und <i>E. coli</i> <i>tRNA<sup>Tyr</sup></i> als <i>Bst</i> NI-Fragment in pTZ18U	[Curnow et al., 1993]

Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angelegt und bei -80 °C gelagert.

### 5.2.3 Gehaltsbestimmung von Lösungen biologischer Polymere

Die Konzentrationsbestimmung der biologischen Polymere erfolgte photometrisch in wässriger Lösung. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm.

#### 5.2.3.1 Gehaltsbestimmung von DNA-Lösungen

Die DNA-Konzentration wurde nach der empirischen Formel für doppelsträngige DNA

$$\mu g \text{ DNA/ml} = A_{260} \times 50 \mu g/ml \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad (5.1)$$

berechnet.

Die Reinheit wurde anhand des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  abgeschätzt. Bei einem Wert von 1,8 - 2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70 - 95 % [Sambrook et al., 1989].

#### 5.2.3.2 Gehaltsbestimmung von *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup>-Lösungen

Der Gehalt von *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup> (ECY2) -Lösungen wurde bei 260 nm photometrisch nach folgender Formel bestimmt:  $1 \mu M \text{ tRNA}^{Tyr} \equiv 0,703 A_{260}$  [Curnow et al., 1993].

Die Reinheit wurde anhand des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  abgeschätzt. Bei einem Wert von 1,8 - 2,0 beträgt die Reinheit der tRNA > 90 % [Sambrook et al., 1989].

#### 5.2.3.3 Gehaltsbestimmung von Protein-Lösungen

Die Gehaltsbestimmung von Protein-Lösungen erfolgte photometrisch bei 280 nm.

Der Absorptionskoeffizient für TGT wurde aus der Aminosäuresequenz der *Z. mobilis* TGT (Wildtyp bzw. Mutante) berechnet [Cantor & Schimmel, 1980]:

$$1 \text{ mg/ml (23,4 } \mu M) \text{ } Z. mobilis \text{ TGT (w.t.)} \equiv 0,778 A_{280}$$

$$1 \text{ mg/ml (23,4 } \mu M) \text{ } Z. mobilis \text{ TGT (Y106F)} \equiv 0,745 A_{280}.$$

Der Absorptionskoeffizient der T7 RNA Polymerase wurde der Arbeit von King et al. [1986] entnommen ( $\epsilon_{280} = 0,14 \times \text{cm}^{-1} \times \mu M^{-1}$ ).



### 5.2.4 Klonierungstechniken

Lösungen, Reaktionsgefäße und Gebrauchsmaterial für den Umgang mit Nukleinsäuren wurden, soweit möglich, autoklaviert (30 min, 121 °C, 1,3 bar), um eventuell vorhandene Nukleasen zu inaktivieren. Glasgeräte wurden durch trockene Hitze (4 h, 180 °C) sterilisiert.

#### 5.2.4.1 Ortsspezifische Mutagenese mittels PCR

Die gezielte Einführung von Mutationen in DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR, [Saiki et al., 1988]) mit dem QuickChange<sup>TM</sup> SITE-DIRECTED MUTAGENESIS KIT (Stratagene) nach dem beigefügten Protokoll. Dabei wird die zu mutierende DNA in wiederholten Zyklen zunächst durch Hitzedenaturierung in Einzelstrang-DNA (ss-DNA) überführt. An dieser ss-DNA wird durch komplementäre Anlagerung der synthetischen Mutantenprimer (MWG-Biotech, Ebersberg) die DNA-Replikation mittels der hitzestabilen *PfuTurbo*<sup>TM</sup> DNA-Polymerase initiiert. Der neu synthetisierte DNA-Strang kodiert nun für das mutierte Gen und wird in mehreren Zyklen amplifiziert. Der unmutierte methylierte Ausgangsstrang wird anschließend mit der Endonuklease *DpnI* verdaut.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µL angesetzt, bestehend aus: 5 - 50 ng DNA-Templat, 1 µL dNTPs (10 mM), je 125 ng der *reverse*- und *forward-primer* (Tab. 5.3), 5 µL 10x-Puffer und 1 µL *PfuTurbo*<sup>TM</sup> DNA-Polymerase (2,5 U/µL).

Die Amplifikation erfolgte in einem *Thermocycler* nach folgendem Protokoll:

30 sec 95 °C, 20 Zyklen [30 sec 95 °C, 60 sec 55 °C], 15 min 68 °C.

**Tab. 5.3** In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer zur ortsspezifischen Mutagenese. Die eingeführte Mutation ist unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz
Y106F-s	5'-G ACG GAT AGC GGC GGG <u>TTC</u> CAG GTG ATG AGC CTA TC-3'
Y106F-a	5'-GA TAG GCT CAT CAC CTG <u>GAA</u> CCC GCC GCT ATC CGT C-3'

#### 5.2.4.2 Transformation

Zur Transformation wurden 100  $\mu\text{L}$  kompetente Zellen (Tab. 5.1) mit 200  $\mu\text{L}$  antibiotikafreiem LB-Medium versetzt und mit 5 ng DNA 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 35 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und 2 min auf Eis abgekühlt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C unter Schütteln (250 U/min) wurden Selektions-Agar-Platten mit bis zu 200  $\mu\text{L}$  dieses Ansatzes beimpft und bei 37 °C über Nacht bebrütet.

#### 5.2.4.3 Plasmid Mini-Präparation

Die Plasmid-Präparation erfolgte mit dem QIAPREP MINIPREP KIT (QIAGEN, Hilden) nach dem beigefügtem Protokoll. Dabei wurden die Zellen zunächst einer alkalischen Lyse unterworfen und anschließend in einem Schritt neutralisiert und zu Hochsalz-Bindungs-Bedingungen gebracht. Denaturierte und ausgefallene Zellbestandteile wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Anionenaustauscher-Säule aufgetragen, wobei durch entsprechende Puffer die Bedingungen so eingestellt wurden, dass nur Plasmid-DNA binden konnte. Nach einem Waschschrift zur Entsalzung wurde die DNA mit Wasser eluiert.

#### 5.2.4.4 Sequenzierung

Der Erfolg der Mutation wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung wurde von MWG (MWG Biotech AG, Ebersberg) durchgeführt.

#### 5.2.5 Präparation der *Z. mobilis* TGT

Zellanzucht, Überexpression, Herstellung des Rohextraktes sowie Aufreinigung der TGT erfolgten nach der von Romier beschriebene Methode [Romier et al., 1996a]. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde zusätzlich eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt.

Folgende Puffer wurden verwendet:

<b>Protein-Extraktions-Puffer:</b>	20 mM Tris (pH 7,8), 10 mM EDTA, 1 mM DTT, auf 50 ml 1 Tablette Complete <sup>TM</sup> (Protease-Inhibitor-Cocktail)
<b>Puffer A:</b>	10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA, 1mM DTT
<b>Puffer B:</b>	Puffer A + 1 M NaCl
<b>Puffer C:</b>	Puffer A + 1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Hochsalz-Puffer:</b>	10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 M NaCl, 0,01 % (w/v) Natriumazid

#### 5.2.5.1 Zellanzucht und Überexpression der *Z. mobilis* TGT in *E. coli*

Zunächst wurde eine Vorkultur der *E. coli* BL21(DE3)/pLysS-Stämme mit dem entsprechenden Überexpressionsplasmid (Tab. 5.1 und 5.2) in 100 ml LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol (Kapitel 5.2.1) bei 37 °C über Nacht angezogen. Nach Verdünnung der Vorkultur (1:1000) im gleichen Medium wurde die Hauptkultur bei 14 °C unter Schütteln (250 U/min) wachsen gelassen. Bei OD<sub>600</sub> = 0,6 - 0,8 wurde mit IPTG in einer Endkonzentration von 1,0 mM die Überexpression induziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, JA-10-Rotor, 4.000 U/min, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden bei -20 °C gelagert.

#### 5.2.5.2 Herstellung eines Rohextraktes

Nach der Überexpression wurden die Zellpellets (Kapitel 5.2.5.1) in 50 ml Protein-Extraktions-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (BRANSON SONIFIER 250, dreimal 2 min, Einstellungen: `duty cycle` 70 %, `output control` 5) auf Eis aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation mit 25.000 U/min (zweimal 45 min, JA-25.50-Rotor, 4 °C) abgetrennt und verworfen. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

#### 5.2.5.3 Ammoniumsulfat-Fällung

In Abwandlung zum Protokoll von Romier et al. [1996a] wurde zur Erhöhung der Ausbeute eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Dazu wurde dem Rohextrakt (Ka-

pitel 5.2.5.2) gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 80 % zugetropft und anschließend 30 min auf Eis gerührt. Die erhaltene Suspension wurde mit 25.000 U/min (30 min, JA-25.50-Rotor, 4 °C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 50 ml Protein-Extraktions-Puffer (ohne Complete<sup>TM</sup>) resuspendiert und über Nacht gegen 5 l Puffer A, der zusätzlich 0,01 % (w/v) Natriumazid enthielt, bei 4 °C im Dialyseschlauch („cutoff“ 10.000 Da) dialysiert.

#### 5.2.5.4 Aufreinigung der TGT mittels Säulenchromatographie

Die Reinigung der *Z. mobilis* TGT erfolgte in zwei säulenchromatographischen Schritten (Q-Sepharose und Phenyl-Sepharose) sowie einer anschließenden präparativen Kristallisation durch Dialyse. Für die Säulenchromatographie wurde eine FPLC-Anlage (ÄKTA FPLC, Amersham Pharmacia Biosciences) verwendet.

Das Dialyseprodukt der Ammoniumsulfatfällung (Kapitel 5.2.5.3) wurde im ersten Schritt auf eine mit zwei Säulenvolumen Puffer A äquilibrierte Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose, XK26, 2,6 x 20 cm) aufgetragen. Nach Waschen mit einem Säulenvolumen Puffer A erfolgte die Elution der TGT mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M (Puffer B) bei etwa 300 mM NaCl (Flussrate 4 ml/min). Die TGT-haltigen Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese identifiziert, vereinigt und mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 1 M versetzt. Diese Lösung wurde für den zweiten chromatographischen Trennschritt auf eine hydrophobe Säule (Phenyl-Sepahrose, XK 16, 1,6 x 10 cm) aufgetragen. Diese wurde zuvor mit zwei Säulenvolumen Puffer C äquilibriert. Gewaschen wurde mit einem Säulenvolumen Puffer C. Die Elution der TGT erfolgte mit einem linearen (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gradienten von 1 bis 0 M (Puffer A) bei etwa 500 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Flussrate 2 ml/min). Nach einer SDS-Page wurden die TGT-haltigen Fraktionen vereinigt und auf eine Proteinkonzentration von etwa 3 mg/ml (Kapitel 5.2.3.3) mit Centriplus YM 30 (Millipore, Schwalbach) eingeengt.

Der letzte Reinigungsschritt erfolgte durch präparative Kristallisation nach Dialyse. Dazu wurde die ankonzentrierte Proteinlösung in 15-ml Dialyse-Kassetten (Slide-A-Lyzer<sup>TM</sup>, Pierce, Niederlande) gefüllt und bei 4 °C über Nacht gegen 5 l Puffer A, der zusätzlich 0,01 % (w/v) Natriumazid enthielt, dialysiert.

Die nach der Dialyse ausgefallenen Mikrokristalle wurden abzentrifugiert (5.000 U/min, 4 °C, 20 min) und durch Lösen im Hochsalz-Puffer auf die gewünschte Konzentration (Kapitel 5.2.3.3) gebracht. Für Kristallisationsexperimente (Kapitel 5.3.1) wurden

Proteinlösungen mit einer Konzentration von 12 - 18 mg/ml angesetzt, für den Enzymassay (Kapitel 5.2.8) von 4 mg/ml. Die Lösungen wurden portioniert (je 30  $\mu$ L für die Kristallisation, je 5  $\mu$ L für den Enzymassay) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Ausbeuten der Proteinreinigung betrugen etwa 9 mg *Z. mobilis* TGT (Wildtyp bzw. Mutante) aus 1 l *E. coli*-Kultur.

### 5.2.6 Präparation der T7 RNA Polymerase

Expression und Aufreinigung der T7 RNA Polymerase erfolgte nach einem Protokoll von Grodberg & Dunn [1988].

Folgende Puffer wurden verwendet:

<b>Tris-Puffer:</b>	50 mM Tris (pH 8,1), 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT
<b>PEDG:</b>	20 mM $\text{PO}_4^{3-}$ (pH 7,5) (2,78 g/l $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,54 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 % Glycerol
<b>Puffer D:</b>	PEDG + 100 $\mu$ M PMSF + 50 mM NaCl
<b>Puffer E:</b>	Puffer D + 1 M NaCl

#### 5.2.6.1 Zellanzucht und Überexpression der T7 RNA Polymerase in *E. coli*

Zunächst wurde eine Vorkultur von *E. coli* BL21/pAR1219 Zellen (Tab. 5.1 und 5.2) in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (Kapitel 5.2.1) bei 37 °C über Nacht angezogen. Mit je 1 ml Vorkultur wurden zweimal 500 ml Hauptkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (250 U/min) wachsen gelassen. Bei  $\text{OD}_{600} = 0,6 - 0,8$  wurde mit IPTG in einer Endkonzentration von 1,0 mM die Überexpression induziert. Nach weiteren 3 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (4.000 U/min, JA-10-Rotor, 4 °C, 15 min) geerntet.

### 5.2.6.2 T7 RNA Polymerase Extraktion

Die Zellen, die die überexprimierte T7 RNA Polymerase enthalten, (Kapitel 5.2.6.1) wurden mit 100 ml Tris-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (4.000 U/min, JA-10-Rotor, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 25 ml Tris-Puffer resuspendiert und mit weiteren 6 ml Tris-Puffer, der zusätzlich 9 mg Lysozym enthielt, versetzt. Die Suspension wurde auf Eis 20 min inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 ml 0,8 %iger Natriumdesoxycholat-Lösung wurde weitere 20 min inkubiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (BRANSON SONIFIER 250, dreimal 2 min, Einstellungen: **duty cycle** 70 %, **output control** 5) aufgeschlossen, mit 5 ml 10 %iger Polymyxin P Lösung (pH 8,0) und 5 ml 2 M Ammoniumsulfat-Lösung versetzt und 20 min auf Eis gerührt. Anschließend wurde 60 min mit 25.000 U/min (4 °C, JA-25.50-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen.

### 5.2.6.3 Reinigung der T7 RNA Polymerase

Als erster Reinigungsschritt wurde eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Dazu wurde dem Rohextrakt (Kapitel 5.2.6.2) unter Rühren auf Eis gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 40 % zugetropft. Nach 20-minütigem Rühren auf Eis wurde 15 min zentrifugiert (25.500 U/min, JA-25.50-Rotor, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Um das Ammoniumsulfat zu entfernen, wurde das Pellet in 50 ml Puffer D gelöst und über Nacht gegen 5 l Puffer D bei 4 °C dialysiert.

Die entsalzte Lösung wurde sterilfiltriert und auf eine mit Puffer D äquilibrierte Anionenaustauscher Säule (Q-Sepharose, XK26, 2,6 x 20 cm) aufgetragen. Nach Waschen mit einem Säulenvolumen Puffer D wurde das Protein mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl eluiert (Flussrate 4 ml / min). Die Elution erfolgte bei ca. 35 % Puffer E. Die Fraktionen, die T7 RNA Polymerase enthalten wurden mit SDS-Page identifiziert (~100 kDa Bande), vereinigt und mit Centriplus YM 50 (Millipore, Schwalbach) auf einen Gehalt von ca. 6 µM ankonzentriert (Kapitel 5.2.3.3). Die Proteinlösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 5.2.7 Präparation und Reinigung von nicht modifizierter *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup>

Die Präparation von nicht modifizierter *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup> (ECY2) erfolgte nach einem Protokoll von Curnow et al. [1993]. Folgende Puffer wurden verwendet:

<b>NaAc-Puffer:</b>	3 M NaAc, pH 5,3
<b>Puffer F:</b>	10 mM HEPES (pH 7,3)
<b>Puffer G:</b>	Puffer F + 2 M NaCl
<b>10x Tx:</b>	400 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT, 10 mM Spermidine
<b>HEPES-Mg-Puffer:</b>	10 mM HEPES (pH 7,3), 1 mM MgCl <sub>2</sub>

#### 5.2.7.1 Ethanol-Fällung

Im Verlauf der Präparation von ECY2 musste mehrfach DNA und tRNA ausgefällt werden. Dazu wurde die Nukleinsäure-haltige Lösung mit 0,1 VT NaAc-Puffer und 2 - 2,5 VT Ethanol p.a. versetzt und über Nacht bei -20 °C aufbewahrt.

#### 5.2.7.2 Plasmid-Präparation und Reinigung

Zwei Liter Ampicillin-haltiges LB-Medium (Kapitel 5.2.1) wurden mit *E. coli* ptRNA2-/XL2-blue Zellen (Tab. 5.1 und 5.2) angeimpft und für 19 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation (4.000 U/min, JA-10-Rotor, 4 °C, 15 min) wurden die Zellen geerntet. Das Plasmid wurde mit einem QIAGEN PLASMID MEGA KIT (QIAGEN, Hilden) nach dem beigefügtem Protokoll isoliert und aufgereinigt. In Abwandlung des Protokolls wurde das Plasmid mit Ethanol ausgefällt (Kapitel 5.2.7.1). Das Plasmid wurde abzentrifugiert (10.000 U/min, JA-10-Rotor, 4 °C, 30 min), in 10 ml Wasser gelöst und nochmals mit Ethanol ausgefällt. Nach abermaliger Zentrifugation (15.000 U/min, JA-25.50-Roter, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mindestens 15 min an der Luft getrocknet, um restlichen Ethanol vollständig zu entfernen. Das Plasmid wurde in Wasser gelöst und der Gehalt und die Reinheit photometrisch bestimmt (Kapitel 5.2.3.1). Der Gehalt wurde auf 1 mg/ml eingestellt. Eine typische Ausbeute beträgt 0,6 mg gereinigtes Plasmid aus 500 ml Kultur.

### 5.2.7.3 Restriktionsverdau von ptRNA2 mit *Bst*N I

Das gereinigte ptRNA2-Plasmid (Kapitel 5.2.7.2) wurde mit der Endonuklease *Bst*N I verdaut, um das DNA-Fragment zu erhalten, das die T7 RNA Polymerase Bindestelle sowie die Sequenz, die für die tRNA<sup>Tyr</sup> kodiert, enthält.

Dazu wurden

- 250  $\mu$ L Templat-DNA (1 mg/ml),
- 5  $\mu$ L *Bst*N I (10.000 U/ml, New England Biolabs),
- 50  $\mu$ L Puffer #2 (New England Biolabs),
- 5  $\mu$ L BSA (100  $\mu$ g/ml, New England Biolabs) und
- 250  $\mu$ L Wasser

über Nacht bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde eine Chloroform-Extraktion durchgeführt. Zunächst wurde der Ansatz mit 1 VT Roti-Phenol und 1 VT 24:1 Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase wurde erneut mit 1 VT 24:1 Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert. Um die anschließende Transkription nicht zu stören, wurde darauf geachtet, dass das Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisch vollständig entfernt wurde. Mit der wässrigen Phase wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt (Kapitel 5.2.7.1). Das durch Zentrifugation (15.000 U/min, JA-25.50-Rotor, 30 min, 15 °C) erhaltene DNA-Pellet wurde mindestens 15 min an der Luft getrocknet, um restlichen Ethanol vollständig zu entfernen. Die DNA wurde in Wasser gelöst und eine Konzentration von 0,6 mg/ml eingestellt (Kapitel 5.2.3.1).

### 5.2.7.4 *In vitro*-Transkription von ECY2

Für die *in vitro*-Transkription von ECY2 wurden

- 600  $\mu$ L 10x Tx-Buffer,
- 1000  $\mu$ L *Bst*N I verdautes Plasmid (1 mg/ml),
- 240  $\mu$ L ATP (100 mM),



- 240  $\mu\text{L}$  CTP (100 mM),
- 240  $\mu\text{L}$  UTP (100 mM),
- 240  $\mu\text{L}$  GTP (100 mM),
- 25  $\mu\text{L}$  anorganische PPase (Roche Diagnostics),
- 5  $\mu\text{L}$  RNase-Inhibitor ( $10 - 50 \times 10^3$  U/ml, Roche Diagnostics),
- 30  $\mu\text{L}$  T7 RNA Polymerase (15  $\mu\text{M}$ , Kapitel 5.2.6) und
- 250  $\mu\text{L}$  Wasser

gemischt und 5 - 7 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der Ansatz zunächst mit 1 VT Roti-Phenol und 1 VT 24:1 Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase wurde erneut mit 1 VT 24:1 Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert. Anschließend wurde die transkribierte tRNA mit Ethanol (Kapitel 5.2.7.1) ausgefällt.

#### 5.2.7.5 Reinigung der ECY2

Die transkribierte tRNA (Kapitel 5.2.7.4) wurde mit einer Anionenaustauschersäule (SOURCE 15Q, HR 10/10) chromatographisch gereinigt. Dazu wurde die tRNA zunächst in Puffer F gelöst. Nach Auftragen auf die Säule und Waschen mit einem Säulenvolumen Puffer F wurde die tRNA mit einem linearen Gradienten von 0 bis 2 M NaCl (Puffer G) eluiert (Flussrate 1,5 ml / min). Die Elution erfolgte bei etwa 22 % Puffer G. Die Fraktionen, die die tRNA erhielten, wurden vereinigt. Die gereinigte tRNA wurde mit Ethanol ausgefällt (Kapitel 5.2.7.1) und abzentrifugiert (10.000 U/min, JA-10-Rotor, 4 °C, 1 h). Das Pellet wurde in 10 ml Wasser gelöst, nochmals mit Ethanol ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (15.000 U/min, JA-25.50-Rotor, 4 °C, 1 h).

#### 5.2.7.6 Monomerisierung der ECY2

Zur Monomerisierung wurde das nach der Reinigung der tRNA erhaltende Pellet (Kapitel 5.2.7.5) mindestens 15 min an der Luft getrocknet, um überschüssiges Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in Puffer F gelöst, wobei eine Konzentration

von kleiner als 20  $\mu\text{M}$  ECY2 eingestellt wurde (Kapitel 5.2.3.2). Die tRNA wurde in ein Wasserbad mit Raumtemperatur gestellt und in etwa 45 min auf 70 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur wurde die tRNA 30 min inkubiert. Nach Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  zu einer Endkonzentration von 1 mM wurde die tRNA 2 h auf Eis gekühlt und anschließend mit Ethanol ausgefällt (Kapitel 5.2.7.1). Nach Abzentrifugation des Pellets (15.000 U/min, JA-25.50-Rotor, 4 °C, 30 min) wurde dieses in HEPES-Mg-Puffer gelöst, so dass eine Konzentration von ca. 200  $\mu\text{M}$  eingestellt wurde. Die Reinheit wurde mittels Gelelektrophorese und durch Bestimmung des Verhältnisses  $A_{260}/A_{280}$  überprüft ( $A_{260}/A_{280}(\text{ECY2}) = 2$ ). Die tRNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 5.2.8 Enzymassay der *Z. mobilis* TGT

Sowohl für die Bestimmung der kinetischen Parameter als auch für die Bestimmung der Inhibitionskonstanten wurde der folgende Puffer verwendet:

**Reaktionspuffer:** 100 mM HEPES (pH 7,3), 20 mM  $\text{MgCl}_2$

#### 5.2.8.1 Bestimmung der kinetischen Parameter

Der Enzymassay der TGT beruht auf der Eigenschaft des Enzyms, das G34 in der Antikodon-Schleife bestimmter tRNAs gegen freies Guanin aus dem Reaktionsansatz auszutauschen [Okada & Nishimura, 1979]. Verwendet man als freies Guanin radioaktiv markiertes Guanin (z. B.  $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin), wird durch den Einbau dieser Base in die tRNA diese radioaktiv markiert. Die kinetischen Parameter können dann aus der Zunahme der Radioaktivität der tRNA gegen die Zeit bestimmt werden [Curnow et al., 1993]. Als tRNA wurde unmodifizierte *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup> (ECY2, Kapitel 5.2.7) eingesetzt. Diese wurde in einem 38  $\mu\text{L}$  Ansatz bestehend aus ECY2 und  $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin im Reaktionspuffer bei 37 °C inkubiert. Die erforderlichen Konzentrationen sind abhängig von den  $K_m$ -Werten von tRNA und Guanin. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Y106F-Mutanten (Kapitel 3.2) betrug die Konzentration des variabel gehaltenen Substrats jeweils 0 - 15  $\mu\text{M}$  und die des zweiten Reaktionspartners 20  $\mu\text{M}$ . Durch Zugabe von TGT in 38  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer wurde die Reaktion gestartet. Die Endkonzentration von TGT betrug 150 nM.

Dem Reaktionsansatz wurden in 1 min-Intervallen innerhalb von 5 min nach Zugabe des Enzyms 15  $\mu\text{L}$ -Aliquots entnommen und auf GF/C-Filterplättchen (Whatman) pipet-

tiert. Zur vollständigen Fällung der tRNA wurden die Filterplättchen sofort in eiskalte 10 %ige (w/v) Trichloressigsäurelösung (TCA) gebracht und darin für 30 min inkubiert. Nach jeweils zweimaligem Waschen für 20 min mit 5 %iger (w/v) TCA und Ethanol wurden die Filterplättchen 30 min bei 60 °C getrocknet. Die experimentelle Zählrate der Radioaktivität (cpm, counts per minute) wurde durch Flüssigszintillations-Zählung in 4 ml Toluolszintillator bestimmt.

Zur Berechnung des eingebauten [8-<sup>3</sup>H]-Guanin in die tRNA wurde der gemessene cpm-Wert nach folgender Beziehung (Gleichung 5.2) in die Stoffmenge  $n_{Guanin}$  [mol] umgerechnet:

$$n_{Guanin}[mol] = \frac{x[cpm] \times \phi[dpm/cpm]}{2,22 \times 10^{12}[dpm/Ci] \times a[Ci/mol]} \quad (5.2)$$

Darin sind:

- x, experimentelle Zählrate der Radioaktivität [cpm];
- a, spezifische Aktivität des [8-<sup>3</sup>H]-Guanin [Ci/mol];
- $\phi$ , Detektorsensitivität [dpm/cpm] (In dieser Arbeit wurde ein Wert von 0,00246 für  $\phi$  verwendet.)

Zudem wurde der Umrechnungsfaktor von Curie (Ci) in die theoretische Zählrate der Radioaktivität (dpm, detections per minutes benutzt ( $1 \text{ Ci} = 2,22 \times 10^{12}$ ).

Die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  [pmol/min] wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden einer Auftragung von  $n_{Guanin}$  [pmol] gegen die Reaktionszeit t [min] ermittelt. Aus der Auftragung von  $v_0$  [pmol/min] gegen die [8-<sup>3</sup>H]-Guanin-Konzentration S [ $\mu$ M] und nicht linearer Kurven-Anpassung an die Henri-Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 5.3) mit dem Programm GRAFIT [Leatherbarrow, 1999]) wurden die Michaelis-Konstante  $K_m$  [ $\mu$ M] und die maximale Geschwindigkeit der Enzymreaktion  $v_{max}$  [pmol/min] bestimmt [Cleland, 1963].

$$v_0 = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (5.3)$$

Die apparente Michaelis-Konstante ( $K_m$ ) ist die Substrat-Konzentration, bei der die halb maximale Geschwindigkeit ( $v_{max}/2$ ) erreicht wird. Sie hängt von der Art des Enzyms und des Substrats sowie von der Temperatur und dem pH-Wert ab. Verläuft die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes sehr viel schneller als die Produktbildung, ist  $K_m$  ein Maß für die Affinität des Enzyms für das Substrat.

Zur Beurteilung der katalytischen Effizienz eines Enzyms wird häufig das Verhältnis  $k_{cat}/K_m$  angegeben (Gleichung 5.4):

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{v_{max}}{[E_t] \times K_m} \quad (5.4)$$

Darin sind [Cleland, 1963]:

- $v_{max}$ , maximale Geschwindigkeit der Enzymreaktion;
- $[E_t]$ , Enzymkonzentration im Ansatz;
- $K_m$ , Michaelis-Konstante.

#### 5.2.8.2 Bestimmung der Inhibitionskonstanten

Inhibitionskonstanten ( $K_i$ -Werte) der Inhibitoren wurden nach der von Grädler [Grädler et al., 2001] modifizierten Methode von Hoops [Hoops et al., 1995b] bestimmt. Zunächst wurde ein 38  $\mu$ L Ansatz bestehend aus bis zu 10 % DMSO, verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors und 300 nM TGT im Reaktionspuffer 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann durch Zugabe desselben Volumens einer Mischung bestehend aus 2 bzw. 4  $\mu$ M [ $8\text{-}^3\text{H}$ ]-Guanin und 16  $\mu$ M ECY2 im Reaktionspuffer gestartet. Dem Reaktionsansatz wurden in 1 min-Zeitabständen 15  $\mu$ L-Aliquots entnommen. Analog zum oben beschriebenen Verfahren (Kapitel 5.2.8.1) wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion bestimmt.

Die Bestimmung der apparenten Inhibitionskonstanten ( $K_i$ -Werte) eines kompetitiven Inhibitors erfolgte nach der Methode von Dixon [Dixon & Webb, 1979]. Danach ist die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion  $v_i$  [ $\mu$ M/min] bei gegebener Inhibitorkonzentration  $I$  [ $\mu$ M ] (Gleichung 5.5):

$$v_i = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m \times (1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]} \quad (5.5)$$

Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  dieser Enzymreaktion schwer reproduzierbar ist, wurde sie für jede Messreihe neu bestimmt. Die Inhibitionskonstante wurde aus dem Verhältnis  $v_0/v_i$  ermittelt. Dazu wurden die Gleichungen 5.3 und 5.5 kombiniert und zu einer neuen Gleichung (Gleichung 5.6) umgeformt:

$$\begin{aligned} v_0 = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad \vee \quad v_i = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m \times (1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]} \\ \implies \frac{v_0}{v_i} \times \frac{K_m + [S]}{K_m} = \frac{1}{K_i} \times [I] + (\frac{[S]}{K_m} + 1) \end{aligned} \quad (5.6)$$

Darin sind [Cleland, 1963]:

- $v_0$ , Anfangsgeschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors;
- $v_i$ , Anfangsgeschwindigkeit in Anwesenheit des Inhibitors;
- $K_m$ , Michaelis-Konstante von [8-<sup>3</sup>H]-Guanin;
- $[S]$ , [8-<sup>3</sup>H]-Guanin-Konzentration;
- $K_m$ , apparente Michaelis-Konstante;
- $K_i$ , apparente Inhibitionskonstante und
- $[I]$ , Inhibitor-Konzentration.

Für  $K_m$  wurde der von Grädler [2000] ermittelte Wert von 0,38  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der Auftragung von  $v_0((K_m + [S])/K_m)/v_i$  gegen die Inhibitor-Konzentration  $I$  [ $\mu\text{M}$ ] nach Gleichung 5.6 und linearer Regression mit dem Programm GRAFIT [Leatherbarrow, 1999] wurde die apparente Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) bestimmt.

Alle Inhibitionskonstanten wurden bei zwei unterschiedlichen [8-<sup>3</sup>H]-Guanin Konzentrationen (1 und 2  $\mu\text{M}$ ) bestimmt. Die aus den jeweiligen Bestimmungen erhaltenen  $K_i$ -Werte wurden gemittelt und die Standardabweichung als Fehlergrenze angegeben.

## 5.3 Proteinstrukturaufklärung

### 5.3.1 Kristallisation der *Z. mobilis* TGT

Die Kristallisation der TGT erfolgte mit der „Hanging-Drop“-Methode nach einem modifizierten Protokoll von Romier [Romier et al., 1996a].

Zur Kristallisation wurde folgende Lösungen verwendet:

- KL1:** 100 mM Tris, pH 8,5, 1 mM DTT, 13 % (w/v) PEG 8.000, 10 % (v/v) DMSO
- KL2:** 100 mM Tris, pH 8,5, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8.000, 10 % (v/v) DMSO
- KL3:** 100 mM MES, pH 6,0, 1 mM DTT, 10 % (w/v) PEG 8.000, 10 % (v/v) DMSO
- KL4:** 100 mM MES, pH 5,5, 1 mM DTT, 8 % (w/v) PEG 8.000, 10 % (v/v) DMSO
- KL5:** 100 mM MES, pH 5,5, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8.000, 10 % (v/v) DMSO.

Bei der Aufreinigung der TGT werden bereits Mikrokristalle erhalten (Kapitel 5.2.5.4). Diese sind aber für eine Röntgenstrukturanalyse zu klein. Deshalb wurden sie zunächst mit einem Hochsalzpuffer, der 2 M NaCl enthielt, eingesalzt (Kapitel 5.2.5.4). Für die Kristallisation wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von 12 - 18 mg/ml eingesetzt. Je 2  $\mu$ L der Proteinlösung wurden mit 2  $\mu$ L Reservoir-Lösung auf einem Deckgläschen vermischt. Mit dem Deckgläschen wurde eine Vertiefung einer 24er Kristallisationsplatte (Hampton Research, USA), die 1 ml der Reservoir-Lösung enthielt, verschlossen und mit Silikonpaste (mittelviskos, Bayer-Silikon) luftdicht abgedichtet. Impfkristalle wurden mit KL1 bei 22 °C gezüchtet. Das Wachstum erfolgte innerhalb weniger Tage. Kristalle mit einer ausreichenden Größe für die Röntgenstrukturanalyse wurden mit der Methode des „Macroseedings“ erhalten. Dazu wurde mit je einem Impfkristall die Proteinlösung, die mit KL2 vermischt war (identische Lösung wie KL1, aber mit niedrigerer PEG-Konzentration), angeimpft. Innerhalb von 3 - 4 Wochen wurden Kristalle mit der Größe 0,7 x 0,7 x 0,2 mm<sup>3</sup> erhalten.

Nach Romier [Romier et al., 1996a] wurde mit einer Lösung gearbeitet, die auf den pH-Wert 8,5 eingestellt war. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bedingungen auf

eine Kristallisation bei pH 5,5 erweitert. Bei diesem pH-Wert denaturierte die TGT bereits teilweise unter Bildung einer Haut. Dies machte das „Macroseeding“ unmöglich. Deshalb wurden die Impfkristalle mit Lösung KL3 bei pH 6,0 gezüchtet. Das Wachstum der Messkristalle erfolgte dann bei pH 5,5 mit Lösung KL4 bzw. KL5. Mit Lösung KL4 wurden bereits nach fünf Tagen, mit Lösung KL5, die eine niedrigere PEG-Konzentration enthielt, nach 3 - 4 Wochen Kristalle in einer geeigneten Größe für die Röntgenstrukturanalyse erhalten.

### 5.3.2 Kokristallisation der *Z. mobilis* TGT mit Liganden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kokristallisations-Bedingungen für die *Z. mobilis* TGT mit Liganden erarbeitet. Dafür wurde die Methode von Romier [Romier et al., 1996a] modifiziert.

Es wurde das Macroseeding, wie im Kapitel 5.3.1 beschrieben, durchgeführt. Allerdings wurde der Lösung KL2 der Ligand zugesetzt. Die Ligand-Konzentration wurde so gewählt, dass keine Präzipitation oder Kristallisation des Liganden während der Wachstumsphase der Proteinkristalle erfolgte. Zum Animpfen wurden im Gegensatz zum oben beschriebenen „Macroseeding“ sehr kleine Kristalle ( $0,1 \times 0,1 \times 0,02 \text{ mm}^3$ ) verwendet. Das Wachstum erfolgte etwas langsamer (4 - 6 Wochen) und es wurden etwas kleinere Kristalle erhalten ( $0,4 \times 0,4 \times 0,1 \text{ mm}^3$ ).

### 5.3.3 „Soaking“ von TGT-Kristallen mit Liganden

Proteinkristalle enthalten in der Regel große Wasserkanäle zwischen den Proteinmolekülen. Diese erlauben eine Diffusion von kleinen Molekülen in die Bindetasche des Proteins („Soaking“). Wenn diese spezifische Wechselwirkungen in der Proteinbindetasche ausbilden und ausreichend löslich sind, kann der Bindungsmodus mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Um die Löslichkeit der Liganden zu erhöhen, wurden die Bedingungen von Grädler et al. [2001] dahingehend modifiziert, dass die DMSO-Konzentration im „Soaking“-Puffer um 10 % auf 20 % erhöht wurde. Als weitere Maßnahme zur Steigerung der Löslichkeit wurde die „Soaking“-Temperatur für sehr schlecht lösliche Liganden von 22 °C auf 40 - 50 °C erhöht.

Für das „Soaking“ wurden daher folgende Bedingungen angewendet: der Ligand wurde zunächst in DMSO gelöst und 1:10 (v/v) in der Kristallisationslösung (KL2, KL4

oder KL5, Kapitel 5.3.1) verdünnt. Die Liganden wurden in Sättigungskonzentration eingesetzt. Um diese auch während des „Soakings“ aufrechtzuerhalten, wurde jeweils eine Suspension mit ungelösten Ligand verwendet. In 5  $\mu$ L dieser Suspension wurde ein ausreichend großer Kristall (Kapitel 5.3.1) mit Hilfe eines „Cryoloops“ (Hampton Research, USA) transferiert und dort nach der „Hanging-drop“-Methode (Kapitel 5.3.1) über 1 ml Reservoirlösung bis zu mehrere Tage bei 22 °C bzw. 40 - 50 °C aufbewahrt. Das „Soaking“ bei erhöhten Temperaturen erfolgte im Trockenschrank. Dieser wurde schrittweise auf die gewünschte Temperatur gebracht.

### 5.3.4 Sammlung von Datensätzen

Die Bestimmung von TGT-Strukturen erfolgte durch Röntgenbeugung. Zur Minimierung von Strahlungsschäden durch die energiereiche Röntgenstrahlung wurde der Kristall unter kryogenen Bedingungen bei ca. -173 °C gemessen. Dazu wurde der Kristall in einem Kryo-Puffer bestehend aus 50 mM HEPES (pH 7,5), 10 % (w/v) PEG 8.000 und 30 % (v/v) Glycerin aufgenommen mit Hilfe eines „Cryoloops“ (Hampton Research, USA) in einem gekühlten Stickstoffstrom (X-stream<sup>TM</sup>, MSC, USA) schockgefroren. Der „Cryoloop“ wurde mit einer magnetischen Halterung auf einem Goniometerkopf befestigt und der Kristall im Primärstrahlengang zentriert. Der Kristall wurde mit einem fokussierten, monochromatischen Röntgenstrahl (Primärstrahl) belichtet. Als Strahlungsquelle wurde eine RIGAKU Drehanode aus Kupfer verwendet. Die Spannung der Röntgenröhre betrug 50 kV bei 90 - 100 mA. Die Cu-K $\alpha$ -Röntgenstrahlung ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) wurde durch Nickel-Platin Doppelspiegel (Yale Mirrors, MSC, USA) fokussiert. Die Detektion der Intensitäten abgebeugter Reflexe erfolgte elektronisch (RAXIS-IV IMAGE PLATE SYSTEM, MSC, USA). Der Abstand zwischen Kristall und Detektor betrug 100 mm. Zur Aufnahme eines Beugungsbildes wurde der Kristall je nach Qualität für 3 bis 5 min mit dem Primärstrahl bestrahlt und dabei um 1° gedreht.

Die Datenreduktion erfolgte mittels des HKL Package (Version 1.96.9), das die Programme XDISPLAYF, DENZO und SCALEPACK beinhaltet [Otwinowski, 1993].

### 5.3.5 Verfeinerung der Datensätze

Zur Bestimmung von TGT-Strukturen wurde die Kristallstruktur der nativen apo-TGT (PDB-Code: 1PUD) [Romier et al., 1996b] als Startmodell verwendet. Die kristallo-



graphische Verfeinerung und die Berechnung der Elektronendichten ( $2|F_o|-|F_c|$  bzw.  $|F_o|-|F_c|$ ) erfolgte mit dem Programm CNS [Brünger et al., 1998]. Zur optimalen Positionierung der Strukturen wurde zunächst eine „rigid-body“-Minimierung durchgeführt. Dabei wurde das Molekül als starre Einheit rotiert und translatiert. Dem schloss sich eine „simulated annealing“-Verfeinerung mit einer Starttemperatur von 3000 K an [Brünger et al., 1990]. In mehreren Zyklen wurde das Modell schließlich verfeinert, wobei als Zielfunktion der kristallographische R-Faktor minimiert wurde. Da die Zahl der Observablen im Verhältnis zur Anzahl der verfeinerten Parameter nicht ausreichend überbestimmt ist, wurden zusätzlich geometrische Parameter als fix vorgegeben berücksichtigt [Engh & Huber, 1991].

Wassermoleküle wurden mit CNS gesetzt. Liganden wurden in SYBYL aufgebaut und minimiert. Parameter- und Topologie-Daten für die Verfeinerung wurden mit dem Programm MOLEMAN [Kleywegt, 1997] erzeugt. Die Einpassung der Liganden in die Elektronendichte sowie manuelle Korrekturen des Proteinmodells erfolgten mit dem Programm O [Jones et al., 1991].

Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsrechnungen zu haben, wurden 10 % der Reflexe zufällig ausgewählt und nicht in die Verfeinerung einbezogen [Brünger, 1992].

Alle Strukturen wurden solange verfeinert, bis in der  $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte keine signifikanten Maxima mehr vorhanden waren.

## 5.4 Methoden des computergestützten Wirkstoff-Designs

Für Molecular Modelling Arbeiten wurden die Programmpakete SYBYL 6.7 und 6.8 [SYBYL] sowie MOLOC 01/05/08 [Moloc] verwendete. Als Workstation diente eine Silicon Graphics O2 (R10000).

### 5.4.1 Berechnung von günstigen Wechselwirkungsfeldern in der Bindetasche

Günstige Wechselwirkungsfelder („Hot Spots“) in der Bindetasche wurden mit den Programmen SUPERSTAR [Verdonk et al., 1999] und DRUGSCORE [Gohlke et al., 2000b] berechnet. Beide Ansätze haben gemeinsam, dass die Protein-Bindetasche zunächst auf ein dreidimensionales Gitter platziert wird. An jedem Gitterpunkt werden dann die Wechselwirkungen einer bestimmter Sonde in Bezug auf die umgebenden Proteinatome berechnet.

#### 5.4.1.1 Berechnungen mit SuperStar

SUPERSTAR basiert auf Informationen über nicht-bindende Wechselwirkungen, die aus einer statistischen Analyse von Packungsmustern in Kristallstrukturen von kleinen Molekülen abgeleitet wurden [Verdonk et al., 1999]. Als Datenbasis dient die ISOSTAR-Datenbank [Bruno et al., 1997]. In dieser Datenbank sind Informationen über Wechselwirkungen als „Scatterplots“ gespeichert. Diese „Scatterplots“ zeigen die Verteilung einer bestimmten Sonde um ein Strukturfragment in Form einer funktionellen Gruppe. SUPERSTAR zerlegt ein Templatmolekül (z. B. eine Bindetasche) in solche Strukturfragmente, für die „Scatterplots“ zusammengestellt wurden. Diese Plots werden dann auf die entsprechenden Teile des Templats überlagert und in zusammengesetzte Dichtekarten konvertiert. Die Dichtekarten können auf Wahrscheinlichkeitsniveaus konturiert werden. Ein Wahrscheinlichkeitsniveau von z. B. 2,0 bedeutet, dass die Kontakte auf einem bestimmten Gitterpunkt mit einer zweimal höheren Wahrscheinlichkeit auftreten, als dies bei einer zufälligen Verteilung zu erwarten wäre.

Als Repräsentant für einen Wasserstoffbrücken-Donor wurden die ungeladene Stickstoff-Sonde und für einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor die neutrale Carbonyl-Sauerstoff- sowie die geladene Carboxylat-Sauerstoff-Sonde gewählt. Hydrophobe Wechselwirkungen wurden mit der aromatischen Kohlenstoff-Sonde charakterisiert. Die Berechnungen wurden mit den Standard-Einstellungen durchgeführt. Als Templatmoleküle wurden die Kristallstrukturen von TGT·4 (PDB-Code 1ENU) und TGT·18 verwendet. In diesen nimmt die TGT-Bindetasche zwei unterschiedlichen Konformationen ein (Abb. 3.10 auf Seite 53). In der Struktur TGT·18 wurden die Wasserstoffatome des Wassermoleküls W1 so ausgerichtet, dass sie entweder als Wasserstoffbrücken-Donor oder Wasserstoffbrücken-Akzeptor in Bezug auf den Liganden fungieren.

Zur graphischen Auswertung wurden die „Hot Spots“ so konturiert, dass relativ scharf abgegrenzte Felder erhalten wurden.

#### 5.4.1.2 Berechnungen mit DrugScore

DRUGSCORE basiert auf Daten, die aus Kristallstrukturen von Ligand-Protein-Komplexen abgeleitet wurden [Gohlke et al., 2000a,b]. Als Datenbasis diente die RELIBASE-Datenbank [Hendlich, 1998]. Die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Protein-Ligand-Kontakte wurde dabei unter Bezug auf einen Referenzzustand in Pseudo-Potenziale konvertiert. Die Auflösung von Kristallstrukturen von Proteinen ist in der Regel zu gering, um Wasserstoffatome zuzuordnen zu können. Deshalb wurden bei der Ableitung der DRUGSCORE-Potenziale Wasserstoffatome im Gegensatz zu SUPERSTAR nicht explizit berücksichtigt. Die Potenziale können sowohl zum Bewerten von Ligand-Protein-Wechselwirkungen („Scoring-Funktion“), als auch zur Vorhersage von ausgezeichneten Wechselwirkungsbereichen in der Bindetasche verwendet werden. Bei der Berechnung von „Hot Spots“ wird der niedrigste Potenzial-Wert, der auf einem Gitterpunkt berechnet wird (das globale Optimum), von DRUGSCORE auf 100 gesetzt. Ein Niveau von z. B. 80 bedeutet, dass der Bereich Funktionswerte von bis zu 20 % über dem globalen Optimum für den betrachteten Atomtyp umschließt.

Als Repräsentant für einen Wasserstoffbrücken-Donor wurden die N.3-Sonde<sup>1</sup> und für einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor die O.2-<sup>1</sup> und O.co2-Sonde<sup>1</sup> gewählt. Hydrophobe Wechselwirkungen wurden mit der C.ar-Sonde<sup>1</sup> charakterisiert. Die Berechnungen

---

<sup>1</sup>SYBYL-Atom-Typ; N.3  $\equiv$  sp.3 N, O.3  $\equiv$  sp.3 O, O.co2  $\equiv$  O einer Carboxylatgruppe, C.ar  $\equiv$  aromatischer Kohlenstoff

wurden mit den Standard-Einstellungen durchgeführt. Es wurden die Kristallstrukturen von TGT·4 (PDB-Code 1ENU) und TGT·18 verwendet. In diesen nimmt die TGT-Bindetasche zwei unterschiedlichen Konformationen ein (Abb. 3.10 auf Seite 53). In der Struktur TGT·18 wurde anstelle des Wasser-Moleküls W1 ein O.3-Atom gesetzt.

Zur graphischen Auswertung wurden die „Hot Spots“ so konturiert, dass relativ scharf abgegrenzte Felder erhalten wurden.

### 5.4.2 Minimierung von Liganden in der Bindetasche

Liganden wurden in der Bindetasche der TGT mit dem MAB-Kraftfeld [Gerber & Müller, 1995] wie es in MOLOC implementiert ist, minimiert. Während der Minimierung wurde die Bindetasche rigide gehalten. Es wurde sowohl die Kristallstruktur von TGT·4 (PDB-Code 1ENU) als auch von TGT·18 verwendet. In diesen nimmt die TGT-Bindetasche zwei unterschiedlichen Konformationen ein (Abb. 3.10 auf Seite 53).

### 5.4.3 Generierung von Datenbanken für das virtuelle Screening

In den verwendeten Datenbanken sind die Moleküle zumeist als 2D-Strukturen gespeichert. Mit CORINA [Sadowski et al., 1997] wurden daraus 3D-Strukturen generiert. Dabei wurden fehlende Wasserstoffatome (z. B. von Carboxylatgruppen) ergänzt und kleine Fragmente, die nicht kovalent mit einem zweiten Molekül verbunden waren (z. B. Gegenionen), entfernt. Anschließend wurden aus den so generierten 3D-Strukturen mit Hilfe des UNITY-Befehl `dbimport` UNITY-Datenbanken erzeugt [UNITY, 2001]. Mit dem Befehl `dbmkscreen` wurden „Macro-Fingerprints“<sup>2</sup> generiert, um die Suche zu beschleunigen.

Folgende Datenbanken wurden verwendet:

- Available Chemicals Directory (ACD) [ACD],

---

<sup>2</sup>In UNITY sind Wasserstoffbrücken-Donoren, -Akzeptoren und hydrophobe Eigenschaften als Makros beschrieben. Enthält ein Molekül eine solche Eigenschaft, wird ein Bit, das dafür kodiert, eingeschaltet. So kann durch ein „Prescreening“ auf das Vorhandensein der Bits die Suche beschleunigt werden.

- IBS Library [IBS],
- ChemStar Library [ChemStar],
- ASINEX Express Gold Collection (AEGC) [Asinex],
- ASINEX Express Platinum Collection (AEPC) [Asinex],
- LeadQuest [LeadQuest] und
- AMBINTER database [Ambinter].

#### 5.4.4 Strukturbasierte Pharmakophor-Generierung

Strukturbasierte Pharmakophor-Modelle wurden mit UNITY [UNITY, 2001] aufgebaut. Die geforderten Wechselwirkungseigenschaften (Wasserstoffbrücken-Donor, -Akzeptor, hydrophobe Gruppe) wurden durch Punkte im Raum beschrieben. Suchtoleranzen wurden durch Kugeln um diese Punkte festgelegt, wobei der Radius der maximalen Abweichung entsprach. Die Direktionalität von Wasserstoffbrücken-Bindungen wurde berücksichtigt, indem die Eigenschaftspunkte auf Ligand-Seite (Wasserstoffbrücken-Donor bzw. -Akzeptor) mit den dazugehörigen komplementären funktionellen Gruppen auf Proteinseite verknüpft wurden.

Die Form der Bindetasche wurde als verbotene Bereiche („`excluded volumes`“<sup>3</sup>) in den Pharmakophor einbezogen.

##### 5.4.4.1 Zusammengesetzter Pharmakophor basierend auf TGT·4 und TGT·18

Der in Kapitel 3.3 beschriebene zusammengesetzte Pharmakophor basiert auf den Kristallstrukturen TGT·4 (PDB-Code 1ENU) und TGT·18. Die beiden Strukturen wurden mit einem Least-Square-Fit der C<sub>α</sub>-Atome überlagert.

Die Positionen der Wasserstoffbrücken-Donoren D1a und D1b (Abb. 3.8 auf Seite 50) entsprechen den Positionen der korrespondierenden Atome von **4**, die des Wasserstoffbrücken-Akzeptors Acc und des Donors D2 den korrespondierenden Atomen von **18**. Die Lage von Acc/don entspricht dem Imidazol-Stickstoff von **18**. Die ambivalente Wasserstoffbrücken-Donor/-Akzeptor-Eigenschaft von Acc/don wurde durch die alternative

<sup>3</sup>„`excluded volumes`“; Bereiche, in denen sich keine Ligandatome befinden dürfen

Verknüpfung („**partial match**“) eines Donors und Akzeptors definiert. Die Lage des Zentrums der hydrophoben Eigenschaft (5- oder 6-Ring) entspricht dem Mittelpunkt des Benzolrings von **4**.

Zur Erfüllung des Pharmakophors reichte es aus, wenn entweder **D2** oder **Acc/don** im Ligand vorhanden war sowie entweder eine Wasserstoffbrücke von **Acc** zu Gly230 oder Gl203 gebildet werden konnte („**partial match**“).

Allen Punkten, die Wechselwirkungseigenschaften festlegen, wurden Suchtoleranzen zugewiesen. Die Radien der Suchtoleranzen auf Ligand-Seite wurden den zu Grunde liegenden „Hot Spots“ (Kapitel 5.4.1) angepasst. Die Radien der verbotenen Bereiche („**excluded volumes**“<sup>3</sup>) auf Proteinseite wurden so eingestellt, dass Liganden in einem Test-Set, bestehend aus bereits bekannten TGT Inhibitoren verschiedener Strukturklassen (**4**, **8**, **56** und **20**), der Pharmakophorhypothese genügten.

#### 5.4.4.2 Pharmakophor basierend auf TGT·4 sowie „Hot Spots“ für Wasserstoffbrücken-Akzeptoren

Der in Kapitel 3.6 beschriebene Pharmakophor basiert auf der Struktur TGT·4 (PDB-Code 1ENU) sowie „Hot Spots“ berechnet für eine Wasserstoffbrücken-Donor-Sonde (Kapitel 5.4.1).

Die Positionen des Wasserstoffbrücken-Akzeptors **Acc1** und des Wasserstoffbrücken-Donors **D1a** (Abb. 3.47 auf Seite 121) entsprechen denen der korrespondierenden Atome von **4**. Die Wasserstoffbrücken-Akzeptoren **Acc2a** und **Acc2b** sowie der Wasserstoffbrücken-Donor **D1b** wurden so platziert, dass sie sich im Zentrum der dazugehörigen „Hot Spots“ befinden. Die hydrophobe Eigenschaft (Zentrum eines 5- oder 6-Rings) wurde manuell zwischen Tyr106 und Met260 positioniert.

Zur Erfüllung des Pharmakophors reichte es aus, wenn der Ligand entweder **Acc2a** oder **Acc2b** sowie entweder **Don1a** oder **Don1b** enthält („**partial match**“).

Allen Punkten, die Wechselwirkungseigenschaften festlegen, wurden Suchtoleranzen zugewiesen. Die Radien der Suchtoleranzen der Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren wurden den zu Grunde liegenden „Hot Spots“ (Kapitel 5.4.1) angepasst. Die Radien der verbotenen Bereiche („**excluded volumes**“<sup>3</sup>) auf Proteinseite wurden so eingestellt, dass Liganden in einem Test-Set, bestehend aus bereits bekannten TGT Inhibitoren verschiedener Strukturklassen ((**4**, **8**, **56** und **20**)), der Pharmakophorhypothese entsprachen. Bei diesem Testlauf wurden die Pharmakophorbestandteile **Acc2a** und **Acc2b** nicht berücksichtigt, da vor der Durchführung des auf diesem Pharmako-

phor basierenden virtuellen Screenings keine Liganden bekannt waren, die funktionelle Gruppen aufweisen, die diesem Pharmakophor entsprachen.

### 5.4.5 Hierarchische Datenbankfilterung

Für das virtuelle Screening wurden die Datenbanken (Kapitel 5.4.3) hierarchisch gefiltert, wobei die einzelnen Schritte in ihrer Komplexität und damit in der benötigten Rechenintensität zunahmen.

Die in Kapitel 3.3 und 3.6 beschreiben virtuellen Screening-Läufe wurden nach einem hierarchischen Protokoll durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Datenbanken (Kapitel 5.4.3) mit der **SELECTOR compound filtering**-Funktion [Selector, 1996] nach Verbindungen mit weniger als acht drehbaren Bindungen und einem Molekulargewicht von weniger als 450 D gefiltert. Im nächsten Schritt wurde nach Verbindungen gesucht, die die erforderliche Mindestanzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren, -Akzeptoren und hydrophoben Eigenschaften besitzen, um die Pharmakophorhypothese (Kapitel 5.4.4) zu erfüllen. Im dritten Schritt wurde in einer flexiblen Suche in UNITY [UNITY, 2001] die strukturbasierte Pharmakophorhypothese verwendet. Bei der in Kapitel 3.6 beschriebenen Suche wurde dabei zusätzlich gefordert, dass die Verbindungen einen aromatischen 5- oder 6-Ring enthalten. Im letzten Schritte wurden als weitere Einschränkung zusätzlich verbotene Volumenbereiche („**excluded volumes**“<sup>3</sup>) einbezogen. Die Rechenzeit wurde im vorletzten Schritt auf 180 sec pro Verbindung und im letzten Schritt auf 300 sec pro Verbindung beschränkt. Im Gegensatz zur Standardeinstellung von UNITY wurde der Lipinski's "rule-of-five"-Check [Lipinski et al., 1997] ausgeschaltet. Der Grund dafür bestand darin, dass es das Ziel des virtuellen Screenings war, neue Leitstrukturkandidaten zu finden und nicht neue Arzneistoffe [Hann et al., 2001; Oprea et al., 2001].

Für das in Kapitel 3.4.3 beschriebenen virtuelle Screening nach Thiolen für die Leitstrukturoptimierung wurde ebenfalls nach einem hierarchischen Protokoll vorgegangen. Im ersten Schritt wurde mit UNITY/ SELECTOR nach aliphatischen Thiolen (SLN<sup>4</sup>: SHCH) gefiltert. Im zweiten Schritt wurde in dieser Hitliste nach Verbindungen gesucht, die genau einer Thiolgruppe enthalten sowie einem Molekulargewicht kleiner 300 Dalton besitzen und nicht mehr als sechs drehbaren Bindungen aufweisen.

<sup>3</sup>SLN: Sybyl Line Notation; Kurzschreibweise für Moleküle

Duplikate wurden aus den Hitlisten mit dem TRIPOS-Skript `nodbdups` entfernt.

### 5.4.6 Dockingmethoden

Um die Verbindungen für das Docking<sup>5</sup> vorzubereiten, wurden zunächst die Protonierungszustände angepasst. Dazu wurden mit einem Script exocyclische Guanidino- und Amidinogruppen sowie primäre und sekundäre aliphatische Aminogruppen protoniert, während Phosphorsäure-, Sulfonsäure- und Carbonsäuregruppen deprotoniert wurden. In den UNITY-Datenbanken ist nur eine tautomere Form pro Verbindung gespeichert. Während der Suche werden andere Tautomere „on the fly“ erzeugt. In den Hitlisten wird aber nur die Form, die auch in den Datenbanken abgelegt ist, gespeichert. Deshalb wurde, falls erforderlich, das dem Pharmakophor entsprechende Tautomer in SYBYL manuell erzeugt.

Zum Docking wurden als Referenz-Strukturen die Komplexe TGT·4 (PDB-Code 1ENU) und TGT·18 verwendet. Als Docking-Programm wurde FLEXX [Rarey et al., 1996] (Version 1.102) benutzt. Während der Komplexbildungsphase wurde die FLEXX-Scoring-Funktion benutzt. Das Partikel-Konzept, das während der inkrementellen Aufbauphase der Liganden Wassermoleküle berücksichtigen kann, wurde aktiviert [Rarey et al., 1999]. Die 30 besten Docking-Lösungen wurden mit der in FLEXX implementierten Version von DRUGSCORE [Gohlke et al., 2000b] nachbewertet. Für die in Kapitel 3.3 und 3.6 beschriebenen virtuellen Screenings wurden anschließend diese Lösungen mit einem PYTHON-Script gefiltert, um diejenige Lösung mit der besten Bewertung zu finden, die gleichzeitig der Pharmakophorhypothese (Kapitel 5.4.4) entspricht. Nur diese Verbindungen wurden im weiteren Vorgehen berücksichtigt.

Bei der Suche nach Fragmenten zur Optimierung von Hits aus dem virtuellen Screening wurden nur die Dockinglösungen auf Platz 1 weiter berücksichtigt.

Die Pterin-Derivate (Kapitel 3.4.3) wurden mit der `Mapref`-Funktion von FLEXX in die Bindetasche gedockt. Dazu wurde der Bindungsmodus des Grundkörpers vorgegeben. Beim Einpassen der Liganden in die Bindetaschen wurden dann nur die Seitenketten-Konformationen berechnet.

---

<sup>5</sup>Einpassen von Liganden in die Bindetasche



## 5.5 Sonstige Methoden

### 5.5.1 Fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen

Für Fluoreszenz-spektroskopischen Untersuchungen wurde ein RF-5301PC-Fluorometer der Firma SHIMADZU benutzt. Der Küvettenhalter wurde durch ein angeschlossenes Wasserbad temperiert. Im Küvettenhalter war eine Rühreinheit eingebaut, so dass die Lösungen in der Küvette durchmischt werden konnten. Es wurde eine 500  $\mu$ L Küvette verwendet.

Die Messungen wurden bei 24 und 37 °C durchgeführt. Die eingesetzten Ligandkonzentrationen betrugen  $0,1 \times K_i$  bis  $50 \times K_i$ , die Proteinkonzentration 50 nM bis 10  $\mu$ M und die tRNA-Konzentration bis zu 20  $\mu$ M. Es wurde derselbe Puffer wie für die Bestimmung der kinetischen Parameter (Kapitel 5.2.8) mit und ohne Magnesium-Zusatz verwendet.

### 5.5.2 SPR-Messungen

SPR-spektroskopische Untersuchungen wurden mit einem BIAcore X Gerät durchgeführt. Es wurde ein SA-Chip (mit Streptavidin beschichteter Goldfilm) verwendet. Der Puffer enthielt 10 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl und 20 mM  $\text{MgCl}_2$ . Die verwendete Ligandkonzentration zum Beladen des Chips betrug 10  $\mu$ M und die Proteinkonzentration im Laufpuffer 500 nM.

### 5.5.3 Bestimmung von Löslichkeiten

Zur Bestimmung von Löslichkeiten von Liganden im „Soaking“-Puffer (Kapitel 5.3.1) wurden gesättigte Lösungen der Liganden hergestellt. Diese wurden über Nacht bei 22 °C inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und aus dem Überstand der Gehalt photometrisch anhand einer Eichkurve mit dem Ultrospec 1000-Photometer der Firma Amersham Pharmacia Biosciences (Uppsala, Schweden) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Soweit ausreichend Substanz zur Verfügung stand, wurden die Werte zweifach gemessen und die Mittelwerte berechnet.

#### 5.5.4 Bestimmung von $pK_a$ -Werten

Die Messung der  $pK_a$ -Werte erfolgte mit dem potentiometrischen Titrationsmessgerät PCA 101 der Firma Sirius Analytical Instruments (Forest Row, England). Die Silber-Silberchlorid-Elektrode wurde mittels pH 7-Phosphatpuffer als Standard und der FOUR PLUS<sup>TM</sup> Standardisierung [Avdeef & Bucher, 1978] von Sirius Analytical Instruments täglich vor Beginn der Messungen kalibriert. Für Messungen mit DMSO-Zusatz wurde die FOUR PLUS<sup>TM</sup> Standardisierung mit 10 % DMSO durchgeführt. Die genaue Konzentration der verwendeten 0,5 M Kalilauge wurde durch dreifache Titration gegen den Standard Kaliumhydrogenphthalat ermittelt. Anschließend wurde die genaue Konzentration der 0,5 M Salzsäure durch Titration gegen die eingestellte Kalilauge bestimmt.

Die zu messende Substanz wurde in 0,15 M Kaliumchloridlösung, bei Messungen mit DMSO-Zusatz zusätzlich in 10 % DMSO, gelöst, so dass die Konzentration der Substanz in Lösung etwa 1 mM betrug. Nachdem ein niedriger pH-Wert mit 0,5 M Salzsäure eingestellt worden war, wurde mit 0,5 M Kalilauge in Richtung höherer pH-Werte titriert und so eine Titrationskurve aufgenommen. Alle Messungen wurden bei 25 °C und unter einer Argonschutzgasatmosphäre durchgeführt.

Die  $pK_a$ -Werte wurden mit der integrierten Software durch Kurvenanpassung der Daten an die Bjerrum-Differenzkurve [Avdeef et al., 1982] mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet.

##### 5.5.4.1 Zuordnung der $pK_a$ -Werte zu Molekülfragmenten

Für die Verbindungen **51** und **52** (Tab. 3.13 auf Seite 83) wurden bei einer Titration von pH 2 - 12 je zwei  $pK_a$ -Werte gemessen (Tab. 3.19 auf Seite 114). Diese Werte fallen jeweils in denselben Bereich (4,5 und 4,4 bzw. 9,1 und 9,8). Verbindung **51** enthält im Gegensatz zu **52** eine zusätzliche 6-NH<sub>2</sub>-Gruppe. Für diese Verbindung wurde unter den verwendeten Titrationsbedingungen kein weiterer  $pK_a$ -Wert gefunden. Folglich muss er außerhalb des Messbereichs ( $< 3,5$ ) liegen. Der tiefere  $pK_a$ -Wert ( $\simeq 4$ ) gehört zur basischen Guanidin-Teilstruktur, der höhere ( $\simeq 9$ ) zur nur sehr schwach sauren Amid-Teilstruktur. Diese Zuweisung erfolgte durch Analogieschluss anhand literaturbekannter Verbindungen.

Die  $pK_a$ -Werte von **55** (Tab. 3.14 auf Seite 89) wurden analog dazu zugeordnet.

Für Verbindung **67** (Abb. 3.43 auf Seite 111) wurden bei einer Titration von pH 2 -12 drei  $pK_a$ -Werte gemessen ( $< 3,5$ ,  $4,5$  und  $9,9$ ). Auf Grund von Löslichkeitsproblemen konnte der tiefste  $pK_a$ -Wert nicht genauer bestimmt werden. In 66 % DMF wurden für diese Verbindung ebenfalls drei  $pK_a$ -Werte gemessen [Keyser & Leonard, 1976]:  $pK_{a1} < 2,0$ ,  $pK_{a2} \simeq 4,5$  und  $pK_{a3} \simeq 9,5$ . Diese Werte sind mit den in dieser Arbeit gemessen vergleichbar. Durch die Messung der UV-Absorption bei verschiedenen pH-Werten wurden die  $pK_a$ -Werte dort wie folgt zugeordnet:  $pK_{a1} \Rightarrow$  Guanidin-Teilstruktur,  $pK_{a2} \Rightarrow$  Imidazol-Teilstruktur und  $pK_{a3} \Rightarrow$  Amid-Teilstruktur. Unterstützt wird diese Annahme durch den  $pK_a$ -Wert von Benzimidazol. Dieser beträgt in Wasser  $\simeq 5,4 - 5,7$  [Catalan et al., 1988; Donkor & Kratochvil, 1993].

Für Verbindung **54** wurden bei einer Titration von pH 2 - 12 ebenfalls drei  $pK_a$ -Werte bestimmt ( $3,5$ ,  $5,3$ , und  $9,8$ ). [3-(1*H*-Imidazol-2-ylsulfanyl)-propyl]-dimethylamin besitzt einen  $pK_a$ -Wert von  $8,6$  (Aminogruppe) und einen von  $5,1$  (Imidazolsulfanyl-Gruppe) [Stern et al., 1984]. Da **54** ebenfalls eine Imidazolsulfanyl-Gruppe besitzt, wurde dieser in Analogie dazu der  $pK_a$ -Wert von  $5,3$  zugeordnet. Die tiefste  $pK_a$ -Wert gehört dann folglich zur Guanidin-Teilstruktur und der höchste zur Amid-Funktion.

# A Anhang

## A.1 Datensammlung und Verfeinerung

Tab. A.1 Datensammlung und Verfeinerung der apo-Struktur(Y106F) und der Komplexe *Z. mobilis* TGT(Y106F)·preQ<sub>1</sub> und *Z. mobilis* TGT·18.

	TGT(Y106F)	TGT(Y106F)·preQ <sub>1</sub>	TGT·18
Raumgruppe	C2	C2	C2
Zellkonstanten:			
a (Å)	90,39	90,25	91,06
b (Å)	64,72	65,02	64,38
c (Å)	71,88	71,40	70,77
$\beta$ (deg)	97,0	96,6	96,5
Auflösung (Å)	40 - 1,95	40 - 1,9	30 - 2,1
Zahl der gemessenen Reflexe	109.129	98.882	87.053
Zahl der unabhängigen Reflexe	29.077	31.900	23.882
Vollständigkeit der Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	96,6 (94,0)	98,2 (96,3)	99,8 (99,4)
R <sub>symm</sub> <sup>a</sup> für alle Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	7,0 (29,4)	6,4 (27,4)	9,5 (30,2)
R <sub>free</sub> <sup>b</sup>	20,3	21,1	23,3
R-Faktor <sup>b</sup>	19,0	18,0	18,8
Zahl der Wassermoleküle	333	365	282
RMS-Abweichung, Winkel (deg.)	1,215	1,177	1,209
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,006	0,005	0,005
Durchschnittlicher B-Faktor (Å <sup>2</sup> :)			
Proteinatome	20,9	20,8	26,0
Ligandatome	-	22,1	32,4
Wasseratome	30,7	30,9	33,1

<sup>a</sup>  $R_{symm} = \sum \|I - \langle I \rangle\| / \sum I$ , wobei  $I$  die gemessene Intensität und  $\langle I \rangle$  die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

<sup>b</sup> Der R<sub>free</sub>-Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus  $\sim 10$  % der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet [Brünger, 1992].

**Tab. A.2** Datensammlung und Verfeinerung der Komplexe *Z. mobilis* TGT-51 (kristallisiert bei pH 8,5 und 5,5) sowie TGT-55 (kristallisiert bei pH 8,5).

	TGT-51, pH 8,5	TGT-51, pH 5,5	TGT-55, pH 8,5
Raumgruppe	C2	C2	C2
Zellkonstanten:			
a (Å)	91,47	91,28	90,71
b (Å)	65,32	65,37	64,99
c (Å)	70,19	69,76	71,07
$\beta$ (deg)	96,17	95,87	96,42
Auflösung (Å)	30 - 1,93	40 - 1,8	40 - 1,8
Zahl der gemessenen Reflexe	111.631	124.545	137.118
Zahl der unabhängigen Reflexe	30.894	37.632	38.107
Vollständigkeit der Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	99,9 (99,9)	99,3 (98,0)	99,6 (99,6)
$R_{symm}^a$ für alle Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	10,8 (32,4)	5,0 (26,2)	5,0 (24,7)
$R_{free}^b$	23,4	21,5	22,9
R-Faktor <sup>b</sup>	19,1	19,6	19,6
Zahl der Wassermoleküle	387	278	413
RMS-Abweichung, Winkel (deg.)	1,480	1,347	1,278
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,007	0,006	0,005
Durchschnittlicher B-Faktor (Å <sup>2</sup> ):			
Proteinatome	19,5	19,5	19,3
Ligandatome	47,6	24,3	58,9
Wasseratome	36,8	28,5	33,2

<sup>a</sup>  $R_{symm} = \sum \|I - \langle I \rangle\| / \sum I$ , wobei  $I$  die gemessene Intensität und  $\langle I \rangle$  die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

<sup>b</sup> Der  $R_{free}$ -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus  $\sim 10$  % der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet [Brünger, 1992].

**Tab. A.3** Datensammlung und Verfeinerung der Komplexe *Z. mobilis* TGT-54 (kristallisiert bei pH 8,5 und 5,5).

	TGT-54, pH 8,5	TGT-54, pH 5,5
Raumgruppe	C2	C2
Zellkonstanten:		
a (Å)	89,77	90,98
b (Å)	64,75	65,29
c (Å)	71,13	70,29
$\beta$ (deg)	95,92	96,31
Auflösung (Å)	40 - 1,7	40 - 1,85
Zahl der gemessenen Reflexe	154.985	124.171
Zahl der unabhängigen Reflexe	44.461	34.776
Vollständigkeit der Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	99,5 (99,2)	99,2 (99,1)
$R_{symm}^a$ für alle Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	5,3 (29,0)	5,9 (25,0)
$R_{free}^b$	24,1	20,8
R-Faktor <sup>b</sup>	19,9	17,9
Zahl der Wassermoleküle	387	366
RMS-Abweichung, Winkel (deg.)	1,220	1,177
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,005	0,006
Durchschnittlicher B-Faktor (Å <sup>2</sup> ):		
Proteinatome	19,1	24,1
Ligandatome	47,3	33,6
Wasseratome	32,6	36,2

<sup>a</sup>  $R_{symm} = \sum \|I - \langle I \rangle\| / \sum I$ , wobei  $I$  die gemessene Intensität und  $\langle I \rangle$  die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

<sup>b</sup> Der  $R_{free}$ -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus  $\sim 10$  % der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet [Brünger, 1992].

**Tab. A.4** Datensammlung und Verfeinerung der apo-Struktur der *Z. mobilis* TGT (kristallisiert bei pH 5,5) und der Komplexe TGT-65 (kristallisiert bei 5,5) sowie TGT-66 (kristallisiert bei pH 5,5) .

	Apo, pH 5,5	TGT-65, pH 5,5	TGT-66, pH 5,5
Raumgruppe	C2	C2	C2
Zellkonstanten:			
a (Å)	90,38	91,39	91,40
a b (Å)	65,37	64,47	65,09
a c (Å)	70,57	71,03	69,85
a $\beta$ (deg)	96,30	96,41	95,85
Auflösung (Å)	40 - 1,9	40 - 2,1	40 - 1,75
Zahl der gemessenen Reflexe	116.335	88.886	141.552
Zahl der unabhängigen Reflexe	32.280	24.075	38.581
Vollständigkeit der Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	99,9 (99,8)	100,0 (100,0)	93,9 (90,5)
$R_{symm}^a$ für alle Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	7,1 (24,4)	7,4 (29,1)	4,3 (21,3)
$R_{free}^b$	20,9	23,6	21,0
R-Faktor <sup>b</sup>	17,1	18,4	18,9
Zahl der Wassermoleküle	358	223	373
RMS-Abweichung, Winkel (deg.)	1,208	1,192	1,157
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,005	0,005	0,006
Durchschnittlicher B-Faktor (Å <sup>2</sup> ):			
Proteinatome	20,8	26,4	23,78
Ligandatome	-	34,1	25,8
Wasseratome	30,5	32,9	34,8

<sup>a</sup>  $R_{symm} = \sum \|I - \langle I \rangle\| / \sum I$ , wobei  $I$  die gemessene Intensität und  $\langle I \rangle$  die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

<sup>b</sup> Der  $R_{free}$ -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus  $\sim 10$  % der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet [Brünger, 1992].

**Tab. A.5** Datensammlung und Verfeinerung der *Z. mobilis* Komplexe TGT-67 (kristallisiert bei pH 8,5 und 5,5).

	TGT-67, pH 8,5	TGT-67, pH 5,5
Raumgruppe	C2	C2
Zellkonstanten:		
a (Å)	90,71	91,20
b (Å)	65,24	65,59
c (Å)	70,63	69,81
$\beta$ (deg)	96,28	96,07
Auflösung (Å)	40 - 1,7	40 - 1,7
Zahl der gemessenen Reflexe	146.476	151.611
Zahl der unabhängigen Reflexe	42.444	44.525
Vollständigkeit der Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	93,9 (93,1)	98,7 (99,3)
$R_{symm}^a$ für alle Daten (%, hoher Auflösungsbereich)	5,9 (22,3)	4,3 (16,7)
$R_{free}^b$	22,4	21,8
R-Faktor <sup>b</sup>	19,5	19,4
Zahl der Wassermoleküle	469	369
RMS-Abweichung, Winkel (deg.)	1,211	1,207
RMS-Abweichung, Bindungen (Å)	0,005	0,005
Durchschnittlicher B-Faktor (Å <sup>2</sup> :)		
Proteinatome	20,6	19,1
Ligandatome	20,2	17,1
Wasseratome	34,1	30,0

<sup>a</sup>  $R_{symm} = \sum \|I - \langle I \rangle\| / \sum I$ , wobei  $I$  die gemessene Intensität und  $\langle I \rangle$  die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

<sup>b</sup> Der  $R_{free}$ -Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus  $\sim 10$  % der Daten berechnet; der R-Faktor wurde mit den Intensitäten der verbleibenden Daten berechnet [Brünger, 1992].



## Literaturverzeichnis

ACD. URL: <http://www.mdli.com>.

Adler, B., Sasakawa, C., Tobe, T., Makino, S., Komatsu, K., & Yoshikawa, M. (1989). A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, 3(5):627–635.

Al-Dossary, F. S., Ong, L. T., Correa, A. G., & Starke, J. R. (2002). Treatment of childhood tuberculosis with a six month directly observed regimen of only two weeks of daily therapy. *Pediatr Infect Dis J*, 21(2):91–97.

Albert, A., Brown, D., & G., C. (1952). Pteridine studies. 3. The solubility and the stability to hydrolysis of pteridines. *J Chem Soc*, Seiten 4219–4232.

Allen, F. H., Davies, J. E., Galloy, J. J., Johnson, O., Kennard, O., Macrae, C. F., Mitchell, E. M., Mitchell, G. F., Smith, L. M., & Watson, D. G. (1991). The development of version-3 and version-4 of the Cambridge Structural Database system. *J Chem Inf Comput Sci*, 31:187–204.

Ambinter. URL: <http://www.ambinter.com>.

Antosiewicz, J., McCammon, J., & Gilson, M. (1996). The determinants of pKas in proteins. *Biochemistry*, 35(24):7819–7833.

Asinex. URL: <http://asinex.com>.

Avdeef, A. & Bucher, J. J. (1978). Accurate measurements of the concentration of hydrogen ions with a glass electrode: calibrations using the Prideaux and other universal buffer solutions and a computer-controlled automatic titrator. *Anal Chem*, 50: 2137–2142.

Avdeef, A., Kearney, D. L., Brown, J. A., & Chemotti, A. R. (1982). Bjerrum plots for the determination of systematic concentration errors in titration data. *Anal Chem*, 54:2322–2326.

Bairoch, A. & Apweiler, R. (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res*, 28(1):454–8.

Bajorath, J. (2002). Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov*, 1(11):882–894.

- Beresford, A. P., Selick, H. E., & Tarbit, M. H. (2002). The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery. *Drug Discov Today*, 7(2):109–116.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28(1):235–242.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F., J., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., & Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol*, 112(3):535–542.
- Böhm, H. & Klebe, G. (1996). Was läßt sich aus der molekularen Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen für das Design neuer Wirkstoffe lernen? *Angew Chem*, 108:2750–2778.
- Böhm, H. J. (1992a). The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors. *J Comput Aided Mol Des*, 6(1):61–78.
- Böhm, H. J. (1992b). LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J Comput Aided Mol Des*, 6(6):593–606.
- Böhm, H. J. (1994). The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des*, 8(3):243–256.
- Böhm, H. J., Böhringer, M., Bur, D., Gmünder, H., Huber, W., Klaus, W., Kostrewa, D., Kühne, H., Lübbers, T., Meunier-Keller, N., & Müller, F. (2000). Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening. *J Med Chem*, 43(14):2664–2674.
- Böhm, H. J. & Stahl, M. (2000). Structure-based library design: molecular modelling merges with combinatorial chemistry. *Curr Opin Chem Biol*, 4(3):283–6.
- Birdsall, B., King, R. W., Wheeler, M. R., Lewis, C. A., J., Goode, S. R., Dunlap, R. B., & Roberts, G. C. (1983). Correction for light absorption in fluorescence studies of protein-ligand interactions. *Anal Biochem*, 132(2):353–61.
- Bissantz, C., Folkers, G., & Rognan, D. (2000). Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J Med Chem*, 43(25):4759–4767.

- Bisswanger, H. (2000). Enzymhemmung. In *Enzymkinetik*. VCH, Weinheim.
- Björk, G. R. & Rasmuson, T. (1998). Links between tRNA modification and metabolism and modified nucleosides as tumor markers. In Grosjean, H. & R., B., editors, *Modification and Editing of RNA*, Seiten 493–615. ASM Press, Washington DC.
- Blundell, T., Abell, C., Cleasby, A., Hartshorn, M., Tickle, I., Parasini, E., & Jhoti, H. (2002). High-Throughput X-Ray Crystallography for Drug Discovery. In Flower, R., editor, *DRUG DESIGN: Cutting Edge Approaches*. The Royal Society of Chemistry Publications Department, in press.
- Bracher, F. & Daab, J. (1995). beta-Carboline alkaloids, Part 8, Regioselective homolytic acetylation of beta-carbolines. *Synth. Commun.*, 25:1557.
- Bracher, F. & Hildebrand, D. (1992). beta-Carbolin-Alkaloide, I: Synthese von 1-Aryl- und 1-Alkenyl-beta-carbolinen durch Palladium-katalysierte Kupplungsreaktionen. *Liebigs Ann. Chem.*, Seite 1315.
- Bracher, F. & Hildebrand, D. (1993a). beta-Carbolin-Alkaloide, II: Tributyl(1-ethoxyvinyl)stannan als C2-Baustein für die Synthese von beta-Carbolin-Alkaloiden. *Liebigs Ann. Chem.*, Seite 837.
- Bracher, F. & Hildebrand, D. (1993b). beta-Carbolin-Alkaloide, IV: Synthese von 1-Alkyl-beta-carbolinen und Strukturrevision von Lycii-Alkaloid I. *Liebigs Ann. Chem.*, Seite 2335.
- Bracher, F. & Hildebrand, D. (1994). 1,9-Dimetalated beta-carbolines. Versatile building blocks for the total synthesis of alkaloids. *Tetrahedron*, 50:12329.
- Bracher, F. & Hildebrand, D. (1996). 1,1'-Bi-pyrido[3,4-b]indolyl, a new dimeric beta-carboline. *J. prakt. Chem./ Chem. Ztg.*, 338:754.
- Bracher, F., Hildebrand, D., & Ernst, L. (1994). beta-Carboline alkaloids, V: Total synthesis of the antimicrobial marine alkaloid eudistomin T. *Arch Pharm (Weinheim)*, 327(2):121–122.
- Brünger, A. T. (1992). The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355:472–474.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M.,

- Simonson, T., & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54(Pt 5):905–921.
- Brünger, A. T., Krukowski, A., & Erickson, J. W. (1990). Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Crystallogr A*, 46(Pt 7): 585–593.
- Bruno, I. J., Cole, J. C., Lommerse, J. P., Rowland, R. S., Taylor, R., & Verdonk, M. L. (1997). IsoStar: a library of information about nonbonded interactions. *J Comput Aided Mol Des*, 11(6):525–537.
- Buchanan, S. G., Sauder, J. M., & Harris, T. (2002). The promise of structural genomics in the discovery of new antimicrobial agents. *Curr Pharm Des*, 8(13):1173–1188.
- Butler, T. (1996). Shigellosis. In Bennet, J. & Plum, F., editors, *Cecil textbook of Medicine*, Seiten 1647–1648.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical Chemistry*. Part 11: Techniques for the Study of Biological Structure and Function. W. H. Freeman, San Francisco.
- Carell, T., Wintner, E. A., & J., R. J. (1994). Screeningverfahren in Lösung zur Isolierung biologisch aktiver Verbindungen aus einer Moleküldatenbank. *Angew Chem*, 106:2162–2164.
- Carlson, H. A. (2002). Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target. *Curr Opin Chem Biol*, 6(4):447–452.
- Catalan, J., Claramunt, R. M., Elguero, J., Laynez, J., Menendez, M., Anvia, F., Quian, J. H., Taagepera, M., & Taft, R. W. (1988). Basicity and acidity of azoles: the annelation effect in azoles. *J Am Chem Soc*, 110(13):4105–4111.
- Chattaway, F. D. & Humphrey, W. S. (1929). The action of o-Phenylendiamine upon dihydroxy tatraic acid. *J Chem Soc*, (645-651).
- ChemStar. URL: <http://www.chemstar.ru>.
- Clark, D. E., Frenkel, D., Levy, S. A., Li, J., Murray, C. W., Robson, B., Waszkowycz, B., & Westhead, D. R. (1995). PRO-LIGAND: an approach to de novo molecular design. 1. Application to the design of organic molecules. *J Comput Aided Mol Des*, 9(1):13–32.

- Cleland, W. (1963). *Biochim Biophys Acta*, 67:104–137.
- Copeland, R. A. (1996). Reversible Inhibitors. In Copeland, R., editor, *Enzymes, A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. VCH, New York.
- Curnow, A. W., Kung, F. L., Koch, K. A., & Garcia, G. A. (1993). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: Gross tRNA structural requirements for recognition. *Biochemistry*, 32(19):5239–5246.
- Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., & Studier, F. W. (1984). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(7):2035–2039.
- Davis, A. & Teague, S. (1999). Die Bedeutung der Balance von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen im Wirkstoff-Rezeptor-Komplex. *Angew. Chem.*, 111:778–792.
- Dawson, R., Elliott, D., Elliot, W., & Jones, K. (1969). *Data for Biochemical Research*. Oxford University press, Oxford, 3. Auflage.
- Dean, P. M. (1995). *Molecular Similarity in Drug Design*. Blackie Academic & Professional, London.
- Deshpande, K. L. & Katze, J. R. (2001). Characterization of cDNA encoding the human tRNA-guanine transglycosylase (TGT) catalytic subunit. *Gene*, 265(1-2):205–212.
- DeWitte, R. & Shakhnovich, E. (1996). SMOG: de Novo design method based on simple, fast, and accurate free energy estimates .1. Methodology and supporting evidence. *J Am Chem Soc*, 118(47):11733–111744.
- Diaz, I., Pedersen, S., & Kurland, C. G. (1987). Effects of *miaA* on translation and growth rates. *Mol Gen Genet*, 208(3):373–376.
- Dixon, M. & Webb, E. (1979). *Enzymes*. Academic Press, New York, 3. Auflage.
- Doman, T. N., McGovern, S. L., Witherbee, B. J., Kasten, T. P., Kurumbail, R., Stallings, W. C., Connolly, D. T., & Shoichet, B. K. (2002). Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *J Med Chem*, 45(11):2213–2221.
- Donkor, K. K. & Kratochvil, B. (1993). Determination of thermodynamic aqueous acid-base stability constants of several benzimidazole derivatives. *J Chem eng Data*, 38(4):569–570.

- Downs, G. M. & Willett, P. (1996). Similarity Searching in Databases of Chemical Structures. In Lipkowitz, K. B. & Boyd, D. B., editors, *Reviews in Computational Chemistry*, volume 7, Seiten 1–66. VCH Publishers, New York.
- Drews, J. (2000). Drug discovery: a historical perspective. *Science*, 287(5460):1960–1964.
- Durand, J. M., Bjork, G. R., Kuwae, A., Yoshikawa, M., & Sasakawa, C. (1997). The modified nucleoside 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine in tRNA of *Shigella flexneri* is required for expression of virulence genes. *J Bacteriol*, 179(18):5777–5782.
- Durand, J. M., Dagberg, B., Uhlin, B. E., & Bjork, G. R. (2000). Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the *virF* gene. *Mol Microbiol*, 35(4):924–935.
- Durand, J. M., Okada, N., Tobe, T., Watarai, M., Fukuda, I., Suzuki, T., Nakata, N., Komatsu, K., Yoshikawa, M., & Sasakawa, C. (1994). *vacC*, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to *tgt*, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 176(15):4627–4634.
- Eftink, M. R. (1997). Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. *Methods Enzymol*, 278:221–257.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr*, 47:392–400.
- Epps, D. E., Mitchell, M. A., Petzold, G. L., VanDrie, J. H., & Poorman, R. A. (1999). A fluorescence resonance energy transfer method for measuring the binding of inhibitors to stromelysin. *Anal Biochem*, 275(2):141–7.
- Ewing, T. J., Makino, S., Skillman, A. G., & Kuntz, I. D. (2001). DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J Comput Aided Mol Des*, 15(5):411–428.
- Farber, G. K. & Petsko, G. A. (1990). The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem Sci*, 15(6):228–234.
- Farkas, W. R., Jacobson, K. B., & Katze, J. R. (1984). Substrate and inhibitor specificity of tRNA-guanine ribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, 781(1-2):64–75.

- Fersht, A. (1985). *Enzyme Structure and Mechanism*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 2. Auflage.
- Fersht, A. R. & Dingwall, C. (1979). Cysteinyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* does not need an editing mechanism to reject serine and alanine. High binding energy of small groups in specific molecular interactions. *Biochemistry*, 18(7):1245–1249.
- Frey, B., McCloskey, J., Kersten, W., & Kersten, H. (1988). New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 170(5):2078–2082.
- Fröhlich, L. G., Kotsonis, P., Traub, H., Taghavi-Moghadam, S., Al-Masoudi, N., Hofmann, H., Strobel, H., Matter, H., Pfeleiderer, W., & Schmidt, H. H. (1999). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 4-amino pteridine derivatives: structure-activity relationship of antagonists of (6R)- 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin cofactor. *J Med Chem*, 42(20):4108–4121.
- Frisch, M. *et al.* (1998). Gaussian 98, Pittsburgh, PA, 1998.
- Gane, P. J. & Dean, P. M. (2000). Recent advances in structure-based rational drug design. *Curr Opin Struct Biol*, 10(4):401–404.
- Gardner, M. J. *et al.* (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906):498–511.
- Gerber, P. R. & Müller, K. (1995). MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry. *J Comput Aided Mol Des*, 9(3):251–268.
- Gohlke, H., Hendlich, M., & Klebe, G. (2000a). Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol*, 295(2):337–356.
- Gohlke, H., Hendlich, M., & Klebe, G. (2000b). Predicting binding modes, binding affinities and 'hot spots' for protein-ligand complexes using a knowledge-based scoring function. *Persp. Drug Discov. Design*, 20:115–144.
- Gohlke, H. & Klebe, G. (2002). Ansätze zur Beschreibung und Vorhersage der Bindungsaffinität niedermolekularer Liganden an makromolekulare Rezeptoren. *Angew Chem*, 114:2764–2798.
- Golisade, A., Herforth, C., Wieking, K., Kunick, C., & Link, A. (2001). Biotin labelling of amines by polymer-assisted solution-phase synthesis. *Bioorg Med Chem Lett*, 11(13):1783–1786.

- Good, A. (2001). Structure-based virtual screening protocols. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 4(3):301–307.
- Good, A. C., Krystek, S. R., & Mason, J. S. (2000). High-throughput and virtual screening: core lead discovery technologies move towards integration. *Drug Discov Today*, 5(12 Suppl 1):61–69.
- Goodford, P. J. (1985). A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem*, 28(7):849–857.
- Grädler, U. (2000). *De Novo-Design und Strukturbestimmung von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase aus Zymomonas mobilis als neues Target der Bakterienruhr*. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Grädler, U., Gerber, H. D., Goodenough-Lashua, D. M., Garcia, G. A., Ficner, R., Reuter, K., Stubbs, M. T., & Klebe, G. (2001). A New Target for Shigellosis: Rational Design and Crystallographic Studies of Inhibitors of tRNA-guanine Transglycosylase. *J Mol Biol*, 306(3):455–467.
- Grimm, C. (2001). *Röntgenkristallographische Studien an Nukleotidfaktor-bindenden Enzymen*. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Grüneberg, S., Stubbs, M. T., & Klebe, G. (2002). Successful virtual screening for novel inhibitors of human carbonic anhydrase: strategy and experimental confirmation. *J Med Chem*, 45(17):3588–3602.
- Grüneberg, S., Wendt, B., & Klebe, G. (2001). Subnanomolar wirksame Inhibitoren aus dem Computerscreening: eine Modellstudie an der humanen Carboanhydrase II. *Angew Chem*, 113(2):404–408.
- Grodberg, J. & Dunn, J. J. (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, 170(3):1245–1253.
- Hale, T. (1998). Bacillary dysentery. In Hausler, W. & Sussman, M., editors, *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, volume 8. Arnold, London.
- Hann, M. M., Leach, A. R., & Harper, G. (2001). Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *J Chem Inf Comput Sci*, 41(3):856–864.



- Hendlich, M. (1998). Databases for protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54(Pt 6 Pt 1):1178–1182.
- Hendrickson, W. & Ogata, C. (1997). Phase Determination from Multiwavelength Anomalous Diffraction Measurements. *Methods Enzymol*, 276:494–523.
- Hiremath, S., Hiremath, D., & Purohit, M. (1983). Synthesis of substituted 2-(5'-oxo-thioxo-1',3',4'-oxadiazol-2'-yl)-indoles and 2-(5'-oxo-thioxo-1,3,4'-oxadiazol-2'-ylamino)indoles. *Indian J Chem Sect B*, 22(6):571–576.
- Hobohm, U. & Sander, C. (1994). Enlarged representative set of protein structures. *Protein Sci*, 3(3):522–524.
- Hoops, G. C., Townsend, L. B., & Garcia, G. A. (1995a). Mechanism-based inactivation of tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli* by 2-amino-5-(fluoromethyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4 (3H)-one. *Biochemistry*, 34(47):15539–15544.
- Hoops, G. C., Townsend, L. B., & Garcia, G. A. (1995b). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: structure-activity studies investigating the role of the aminomethyl substituent of the heterocyclic substrate PreQ1. *Biochemistry*, 34(46):15381–15387.
- IBS. URL: <http://www.ibscreen.com>.
- Inglese, J. (2002). Expanding the HTS paradigm. *Drug Discov Today*, 7(18 (Suppl.)): S105–106.
- Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Kijimoto, T., Nameki, N., Watanabe, M., Kondo, H., Sekine, M., Okada, N., Nishimura, S., & Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase. *J Mol Biol*, 318(3):665–677.
- Ishiwata, S., Katayama, J., Shindo, H., Ozawa, Y., Itoh, K., & Mizugaki, M. (2001). Increased expression of queuosine synthesizing enzyme, tRNA-guanine transglycosylase, and queuosine levels in tRNA of leukemic cells. *J Biochem (Tokyo)*, 129(1):13–27.
- Jacobson, K. B., Farkas, W. R., & Katze, J. R. (1981). Presence of queuine in *Drosophila melanogaster*: correlation of free pool with queuosine content of tRNA and effect of mutations in pteridine metabolism. *Nucleic Acids Res*, 9(10):2351–2366.

- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 267(3):727–748.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., & Kjeldgaard (1991). Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, 47(Pt 2):110–119.
- Karlsson, R., Kullman-Magnusson, M., Hamalainen, M. D., Remaeus, A., Andersson, K., Borg, P., Gyzander, E., & Deinum, J. (2000). Biosensor analysis of drug-target interactions: direct and competitive binding assays for investigation of interactions between thrombin and thrombin inhibitors. *Anal Biochem*, 278(1):1–13.
- Kersten, H. (1983). Alteration of tRNA modification in eukaryotes: causes and consequences. *Recent Results Cancer Res*, 84:255–263.
- Keyser, E. G. & Leonard, J. N. (1976). Linear benzoguanine. Synthesis by two independent methods. *J Org Chem*, 41(22):3529–3532.
- King, G. C., Martin, C. T., Pham, T. T., & Coleman, J. E. (1986). Transcription by T7 RNA polymerase is not zinc-dependent and is abolished on amidomethylation of cysteine-347. *Biochemistry*, 25(1):36–40.
- Kittendorf, J. D., Barcomb, L. M., Nonekowski, S. T., & Garcia, G. A. (2001). tRNA-Guanine Transglycosylase from *Escherichia coli*: Molecular Mechanism and Role of Aspartate 89. *Biochemistry*, 40(47):14123–14133.
- Klebe, G. (2000). Recent developments in structure-based drug design. *J Mol Med*, 78(5):269–281.
- Klebe, G. & Mietzner, T. (1994). A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations. *J Comput Aided Mol Des*, 8(5):583–606.
- Kleywegt, G. J. (1997). Validation of protein models from Calpha coordinates alone. *J Mol Biol*, 273(2):371–376.
- Kotloff, K., Winickoff, J., Ivanoff, B., Clemens, J., Swerdlow, D., Sansonetti, P., Adak, G., & Levine, M. (1999). Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization (WHO Bull.)*, 77(8):651–666.
- Kuchino, Y., Kasai, H., Nihei, K., & Nishimura, S. (1976). Biosynthesis of the modified nucleoside Q in transfer RNA. *Nucleic Acids Res*, 3(2):393–398.

- Kung, F. L. & Garcia, G. A. (1998). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: recognition of full-length 'queuine-cognate' tRNAs. *FEBS Lett*, 431(3):427–432.
- Kung, F. L., Nonekowsky, S., & Garcia, G. A. (2000). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: recognition of noncognate-cognate chimeric tRNA and discovery of a novel recognition site within the TpsiC arm of tRNA(Phe). *Rna*, 6(2): 233–244.
- Lahana, R. (1999). How many leads from HTS? *Drug Discov Today*, 4(10):447–448.
- Lander, E. S. *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921.
- Leach, A. R. & Kilvington, S. R. (1994). Automated molecular design: a new fragment-joining algorithm. *J Comput Aided Mol Des*, 8(3):283–98.
- LeadQuest. URL: <http://leadquest.tripos.com>.
- Leatherbarrow, R. (1999). GraFit, 4.09 edit., Erithacus Software Limited, USA.
- Lesuisse, D., Lange, G., Deprez, P., Benard, D., Schoot, B., Delettre, G., Marquette, J. P., Broto, P., Jean-Baptiste, V., Bichet, P., Sarubbi, E., & Mandine, E. (2002). SAR and X-ray. A new approach combining fragment-based screening and rational drug design: application to the discovery of nanomolar inhibitors of Src SH2. *J Med Chem*, 45(12):2379–87.
- Levene, Bass, & Simms (1926). ??? *J Biol Chem*, 70:126.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 23(1-3):3–25.
- Luo, J. K. & Castle, R. N. (1991). The Synthesis of Two Novel Fused Thionopyridopyridazines. *J Heterocycl Chem*, 28(1):205–208.
- Maggio, E. T. & Ramnarayan, K. (2001). Recent developments in computational proteomics. *Trends Biotechnol*, 19(7):266–72.
- Markgren, P. O., Hamalainen, M., & Danielson, U. H. (1998). Screening of compounds interacting with HIV-1 proteinase using optical biosensor technology. *Anal Biochem*, 265(2):340–50.

- Markgren, P. O., Hamalainen, M., & Danielson, U. H. (2000). Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology. *Anal Biochem*, 279(1):71–8.
- Meyer, E. A., Brenk, R., Castellano, R. K., Furler, M., Klebe, G., & Diederich, F. (2002). De novo design, synthesis, and in vitro evaluation of inhibitors for prokaryotic tRNA-guanine transglycosylase: a dramatic sulfur effect on binding affinity. *Chembiochem*, 3(2-3):250–3.
- Miranker, A. & Karplus, M. (1991). Functionality maps of binding sites: a multiple copy simultaneous search method. *Proteins*, 11(1):29–34.
- Miranker, A. & Karplus, M. (1995). An automated method for dynamic ligand design. *Proteins*, 23(4):472–90.
- Mittl, P. R. & Grutter, M. G. (2001). Structural genomics: opportunities and challenges. *Curr Opin Chem Biol*, 5(4):402–8.
- Molecular-Probes (2002). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. URL: <http://www.probes.com/handbook/>.
- Moloc. A Molecular Design Software Suite, 01/05/08 edit., Gerber Molecular Design, Amden, Switzerland.
- Moon, J. B. & Howe, W. J. (1991). Computer design of bioactive molecules: a method for receptor-based de novo ligand design. *Proteins*, 11(4):314–328.
- Mowat, J. H., Boothe, J. H., Hutchings, B. L., Stokstad, E. L. R., Waller, C. W., Angier, R. B., Semb, J., Cosulich, D. B., & SubbaRow, Y. (1948). The Structure of the Liver L. casei Factor. *J Am Chem Soc*, 70(1):14–18.
- Noguchi, S., Nishimura, Y., Hirota, Y., & Nishimura, S. (1982). Isolation and characterization of an Escherichia coli mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase. Function and biosynthesis of queuosine in tRNA. *J Biol Chem*, 257(11):6544–6550.
- Nonekowsky, S. T. & Garcia, G. A. (2001). tRNA recognition by tRNA-guanine transglycosylase from Escherichia coli: the role of U33 in U-G-U sequence recognition. *RNA*, 7(10):1432–1441.
- Nonekowsky, S. T., Kung, F. L., & Garcia, G. A. (2002). The Escherichia coli tRNA-guanine transglycosylase can recognize and modify DNA. *J Biol Chem*, 277(9):7178–7182.

- Nærum, L., Graedler, U., & Klebe, G. (2001). Virtual screening based on tRNA-Guanine transglycosylase. In H.-D. Höltje, W. S., editor, *Rational Approaches to Drug Design*, Seiten 400–402. Prous Science, Barcelona.
- Okada, N. & Nishimura, S. (1979). Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 254(8):3061–3066.
- Oliver, S. F. & Abell, C. (1999). Combinatorial synthetic design. *Curr Opin Chem Biol*, 3(3):299–306.
- Oprea, T. I., Davis, A. M., Teague, S. J., & Leeson, P. D. (2001). Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *J Chem Inf Comput Sci*, 41(5):1308–1315.
- Otwinowski, Z. (1993). DENZO, Yale University, New Haven, CT.
- Paiva, A. M., Vanderwall, D. E., Blanchard, J. S., Kozarich, J. W., Williamson, J. M., & Kelly, T. M. (2001). Inhibitors of dihydrodipicolinate reductase, a key enzyme of the diaminopimelate pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta*, 1545(1-2):67–77.
- Parsot, C., Menard, R., Gounon, P., & Sansonetti, P. J. (1995). Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. *Mol Microbiol*, 16(2):291–300.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(8):2444–2448.
- Perrin, D. (1965). *Dissociation constants of organic bases in aqueous solution*. (Chemistry, I. U. o. P. a. A., Ed.), Butterworths, London.
- Philipp, W. J., Poulet, S., Eiglmeier, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., Bergh, S., Bloom, B. R., Jacobs, W. R., J., & Cole, S. T. (1996). An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(7):3132–3137.
- Rarey, M., Kramer, B., & Lengauer, T. (1999). The particle concept: placing discrete water molecules during protein- ligand docking predictions. *Proteins*, 34(1):17–28.
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., & Klebe, G. (1996). A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol*, 261(3):470–489.

- Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G., & Stubbs, M. T. (2002). Trypsin Mutants for Structure-Based Drug Design: Expression, Refolding and Crystallisation. *Biol Chem*, 383(7): 1309–1314.
- Reardon, D. & Farber, G. K. (1995). The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *Faseb J*, 9(7):497–503.
- Reuter, K. & Ficner, R. (1995). Sequence analysis and overexpression of the *Zymomonas mobilis* tgt gene encoding tRNA-guanine transglycosylase: purification and biochemical characterization of the enzyme. *J Bacteriol*, 177(18):5284–5288.
- Rich, R. L. & Myszka, D. G. (2000). Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol*, 11(1):54–61.
- Romier, C., Ficner, R., Reuter, K., & Suck, D. (1996a). Purification, crystallization, and preliminary x-ray diffraction studies of tRNA-guanine transglycosylase from *Zymomonas mobilis*. *Proteins*, 24(4):516–519.
- Romier, C., Ficner, R., & Suck, D. (1998). Structural Basis of Base Exchange by tRNA Guanine Transglycosylase. In Grosjean, H. & Benne, R., editors, *Modification and editing of RNA*, Seiten 169–182. ASM Press, Washington, D.C.
- Romier, C., Meyer, J. E., & Suck, D. (1997). Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylases from the three kingdoms. *FEBS Lett*, 416(1):93–98.
- Romier, C., Reuter, K., Suck, D., & Ficner, R. (1996b). Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. *Embo J*, 15(11): 2850–2857.
- Romier, C., Reuter, K., Suck, D., & Ficner, R. (1996c). Mutagenesis and crystallographic studies of *Zymomonas mobilis* tRNA- guanine transglycosylase reveal aspartate 102 as the active site nucleophile. *Biochemistry*, 35(49):15734–15739.
- Rotstein, S. H. & Murcko, M. A. (1993). GenStar: a method for de novo drug design. *J Comput Aided Mol Des*, 7(1):23–43.
- Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J., & Moras, D. (1991). Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science*, 252(5013):1682–1689.

- Sack, R. B., Rahman, M., Yunus, M., & Khan, E. H. (1997). Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. *Clin Infect Dis*, 24 Suppl 1:S102–105.
- Sadowski, J., Schwab, C., & Gasteiger, J. (1997). CORINA, 3D Structure Generator, 2.0 edit., University Erlangen-Nürnberg.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–491.
- Sakai, T., Sasakawa, C., & Yoshikawa, M. (1988). Expression of four virulence antigens of *Shigella flexneri* is positively regulated at the transcriptional level by the 30 kiloDalton virF protein. *Mol Microbiol*, 2(5):589–597.
- Sambrook, T., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 2. Auflage.
- Sanchez, R., Pieper, U., Melo, F., Eswar, N., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Mirkovic, N., & Sali, A. (2000). Protein structure modeling for structural genomics. *Nat Struct Biol*, 7 Suppl:986–990.
- Sansonetti, P. J. (1998). Slaying the Hydra all at once or head by head? *Nat Med*, 4(5 Suppl):499–500.
- Sansonetti, P. J. (2001a). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280(3):G319–323.
- Sansonetti, P. J. (2001b). Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol Rev*, 25:3–14.
- Schaefer, T., Hazendonk, P., & McKinnon, D. M. (1995). <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F, and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Approaches to the Barrier to Rotation about the Csp<sup>2</sup>-Csp<sup>3</sup> bond in 1,1,1-trifluoro-2-phenyl-ethane. Proximate Coupling Constants and Molecular Orbital Computations. *Can J Chem*, 73:1387–1394.
- Schaefer, T., Sebastian, F., Salman, S. R., Baleja, J., Penner, G., & McKinnon, D. (1991). The proximate coupling constant, <sup>5</sup>J(H, CH<sub>3</sub>), and the torsional mobility of the thiomethyl group in some thiomanisole derivatives. *Can J Chem*, 69:620–624.

- Schafferhans, A. & Klebe, G. (2001). Docking ligands onto binding site representations derived from proteins built by homology modelling. *J Mol Biol*, 307(1):407–427.
- Selector (1996). Tripos Inc., St. Louis MO 63144.
- Shindo-Okada, N., Okada, N., Ohgi, T., Goto, T., & Nishimura, S. (1980). Transfer ribonucleic acid guanine transglycosylase isolated from rat liver. *Biochemistry*, 19(2):395–400.
- Shoichet, B. K., McGovern, S. L., Wei, B., & Irwin, J. J. (2002). Lead discovery using molecular docking. *Curr Opin Chem Biol*, 6(4):439–446.
- Sills, M. A. (1998). Future considerations in HTS: the acute effect of chronic dilemmas. *Drug Discov Today*, 3(7):304–312.
- Slany, R. K., Bosl, M., Crain, P. F., & Kersten, H. (1993). A new function of S-adenosylmethionine: the ribosyl moiety of AdoMet is the precursor of the cyclopentenediol moiety of the tRNA wobble base queuine. *Biochemistry*, 32(30):7811–7817.
- Slany, R. K. & Kersten, H. (1994). Genes, enzymes and coenzymes of queuosine biosynthesis in procaryotes. *Biochimie*, 76(12):1178–1182.
- Smith, A. (2002). Screening for drug discovery: the leading question. *Nature*, 418(6896):453–459.
- Sotriffer, C., Klebe, G., Stahl, M., & Böhm, H. J. (2003). Docking and Scoring Functions and Virtual Screening. In Abraham, D. J., editor, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, volume in press. Wiley.
- Stahl, M. & Rarey, M. (2001). Detailed analysis of scoring functions for virtual screening. *J Med Chem*, 44(7):1035–1042.
- Sterk, G. J., van der Goot, H., & Tlimmerman, H. (1984). Studies on histaminergic compounds. Part II. - Synthesis and histamine H<sub>2</sub>-activity of dimaprit and some of its analogues. *Eur J Med Chem*, 19(6):545–550.
- Storm, C. B., Shiman, R., & Kaufman, S. (1971). Preparation of 6-substituted pterins via the Isay reaction. *J Org Chem*, 36(25):3925 – 3927.
- Swindells, M. B. & Overington, J. P. (2002). Prioritizing the proteome: identifying pharmaceutically relevant targets. *Drug Discov Today*, 7(9):516–521.



- SYBYL. Molecular Modeling Software, 6.8 edit., Tripos, Inc., St. Louis, MO.
- Taylor, E. C. & Dumas, D. J. (1981). Pteridines .48. Utilization of 3,3-Dimethoxy-2-pyrrolidinopropene for the Synthesis of Folic Acid, N<sup>2'</sup>-Acetyl-7-folic Acid, and 5-Deaza-7-folic Acid. *J Org Chem*, 46:1394–1402.
- UNITY (2001). Chemical Information Software, 4.2.1 edit., Tripos Inc., St. Louis MO.
- Usami, M., Mitsunaga, K., & Ohno, Y. (2002). Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81(1):47–55.
- Venter, J. C. *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304–1351.
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., & Taylor, R. (1999). SuperStar: a knowledge-based approach for identifying interaction sites in proteins. *J Mol Biol*, 289(4):1093–1108.
- Verlinde, C. L. & Hol, W. G. (1994). Structure-based drug design: progress, results and challenges. *Structure*, 2(7):577–587.
- von Itzstein, M., Wu, W. Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M. L., White, H. F., Oliver, S. W., & et al. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, 363(6428):418–423.
- Waller, C. W., Fahrenbach, M. J., Boothe, J. H., Angier, R. B., Hutchings, B. L., Mowat, J. H., F., P. J., & Semb, J. (1952). 7-Isomer of Pteroylglutamic Acid. *J Am Chem Soc*, 74:5405–5407.
- Walters, W. P., Stahl, M. T., & Murcko, M. A. (1998). Virtual Screening: An overview. *Drug Discov Today*, 3(4):160–178.
- Ward, L. D. (1985). Measurement of ligand binding to proteins by fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol*, 117:400–414.
- Wartell, M. A., Kleinmann, M. T., Huey, B. M., & Duffey, L. M. (2000). Threat and Risk Assessment. In *Strategies to Protect the Health of Deployed U.S. Forces: Force Protection and Decontamination*. The national academies, Washington, D. C.
- WHO (1997). New strategies for accelarting Shigella vaccine development. *Weekly epidemiological record*, 72:73–80.

WHO (2000). The Big Guns of Resistance. In *Overcoming Antimicrobial Resistance, World Health Report on Infectious Diseases*. <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/index.html>.

# Danksagung

- Herrn Prof. Dr. G. KLEBE danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung und die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.
- Ein besonderer Dank geht an HANS-DIETER GERBER für die Synthese zahlreicher Verbindungen.
- Dr. ULRICH GRÄDLER danke ich für die Einarbeitung in die praktischen Methoden dieser Arbeit.
- JEFF KITTENDORF danke ich für die Einweihung in die Geheimnisse der tRNA *in vitro* Transkription. Prof. Dr. GEORGE GARCIA sowie den weiteren MitarbeiterInnen seiner Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme und Betreuung (auch außerhalb der Arbeitszeiten) während meines Aufenthalts in ihrem Labor.
- EMMANUEL MEYER und Prof. Dr. F. DIEDERICH von der ETH Zürich sowie Prof. Dr. F. BRACHER von der LMU München danke ich für die gute Zusammenarbeit.
- Ich danke allen Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe Klebe für die Hilfsbereitschaft, viele interessante Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Ich danke meinen LiteraturarbeiterInnen ANDREAS STEFFEN, SEBASTIAN TÄTZ, FRAUKE BÖTTCHER und CARLOS VAN HEMELRIJCK für ihre geleistete Arbeit, deren Ergebnisse zum Teil hier eingeflossen sind.
- Für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Dr. ANDREAS HEINE, BERNHARD STENGL, CHRISTIAN PEIFER, Dr. CHRISTOPH SOTRIFER, EDITH BRENK und Dr. KLAUS REUTER.
- Bei Dr. STEFAN SCHMITT bedanke ich mich für die Überlassung der LaTeX-Vorlage. So wird das LaTeX-Lernen leicht gemacht.
- Meinen Eltern danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und die Unterstützung meines Studiums.

- Für die gute musikalische Unterstützung bedanke ich mich bei den *Toten Hosen*, *Selig*, *Farin Urlaub* und dem *Untergangskommando*. „Und die Erde wird sich immer weiter drehen“.
- CHRISTIAN SOHN danke ich für die Unterstützung bei Laborarbeiten sowie für die Betreuung des Röntgendiffraktometers.
- Ein Dankeschön geht auch an die Admins für einsatzbereite Rechner und die Systemadministration.
- LEA ANN DAILEY und Prof. Dr.T. KISSEL danke ich für die Möglichkeit, den Szintillationszähler zu nutzen und SILKE HUTSCHENREITER (AK Tampé, Uni Frankfurt) für die Einweisung und Hilfestellungen bei der Arbeit am BIAcore-Gerät.

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Posterbeiträge, Vorträge und Publikationen hervorgegangen:

#### **Posterbeiträge:**

- Brenk, R., Gerber, H-D., Nærum, L., Klebe, G., *De novo design of inhibitors for the TGT*. Poster präsentiert bei der Model(l)ing 2001-Tagung, Erlangen (2001). (Das Poster wurde mit einem Posterpreis ausgezeichnet).
- Brenk, R., Gerber, H-D., Nærum, L., Klebe, G., *De novo design of inhibitors for the TGT*. Poster präsentiert bei der Jahrestagung der DPhG , Halle (2001).
- Brenk, R., Gerber, H-D., Nærum, L., Klebe, G., *Structure-based De novo design of Inhibitors for the TGT*. Poster präsentiert beim 5th European Graduate Student Meeting, Frankfurt (2002).
- Brenk, R., Gerber, H-D., Nærum, L., Klebe, G., *Virtual screening for submicromolar leads of TGT based on a new surprising binding mode detected by crystal structure analysis*. Poster präsentiert beim 16. Darmstädter Molecular-Modelling Workshop, Darmstadt (2002).
- Brenk, R., Nærum, L., Klebe, G., *Structure-based Virtual Screening for novel micromolar and submicromolar Inhibitors of TGT*. Poster präsentiert beim 14<sup>th</sup> European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships, Bournemouth / Großbritannien, (2002).

#### **Vorträge:**

- Brenk, R., Gerber, H-D., Nærum, L., Klebe, G., *De novo design of inhibitors for the TGT*. Vortrag präsentiert beim 15. Darmstädter Molecular-Modelling Workshop, Darmstadt (2001).
- Brenk, R., Gerber, H-D., Nærum, L., Klebe, G., *Structure-based De novo design of Inhibitors for the TGT*. Vortrag präsentiert beim 5th European Graduate Student Meeting, Frankfurt (2002).
- Brenk, R., Nærum, L., Klebe, G., *Structure-based Virtual Screening for novel micromolar and submicromolar Inhibitors of TGT*. Vortrag präsentiert bei der Fachgruppentagung der DPhG, Travemünde, (2002).

- Brenk, R., Nærum, L., Klebe, G., *Structure-based Virtual Screening for novel micromolar and submicromolar Inhibitors of TGT*. Vortrag präsentiert bei der Jahrestagung der DPhG, Berlin, (2002).

#### Aufsätze:

- Meyer, E. A., Brenk, R., Castellano, R. K., Furler, M., Klebe, G., Diederich, F., *De novo design, synthesis, and in vitro evaluation of inhibitors for prokaryotic tRNA-guanine transglycosylase: a dramatic sulfur effect on binding affinity. Chembiochem*, 3 (2002), 250-253
- Brenk, R., Nærum, L., Grädler, U., Gerber, H-D., Garcia, G. A., Reuter, K., Stubbs, M. T., Klebe, G., *Virtual screening for submicromolar leads of TGT based on a new unexpected binding mode detected by crystal structure analysis.* angenommen bei *J Med Chem*

Die Strukturen der Komplexe TGT·**18**, TGT·**54** und TGT·**55** sind mit den Codes 1N2V, 1K4G und 1K4H in der PDB-Datenbank abgelegt.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

*„Virtuelles Screening, strukturbasiertes Design und Kristallstrukturanalyse von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase, ein Target der Bakterienruhr “*

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch in keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 22. Dezember 2002

(Ruth Brenk)





# Lebenslauf

Ruth Brenk

Geburtstag:	12. April 1974
Geburtsort:	Jugenheim, jetzt Seeheim-Jugenheim
Sept. 1980 – Jul. 1984	<i>Peter-Schöffler Schule</i> Gernsheim
Sept. 1984 – Jul. 1986	Förderstufe der <i>Johannes-Gutenberg Schule</i> Gernsheim
Sept. 1986 – Jul. 1993	<i>Gymnasium Gernsheim</i>
Jul. 1993	Abitur
Sept. 1993 – Aug. 1994	Freiwilliges Soziales Jahr in der Sozialstation <i>St. Lioba</i> Worms
Okt. 1994	Immatrikulation im Studiengang Pharmazie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Aug. 1996	1. Staatsexamen
Apr. 1997	Aufnahme in das <i>Cusansuswerk</i> , Bischöfliche Studienförderung
Okt. 1998	2. Staatsexamen
Nov. 1998 – Apr. 1999	1. Hälfte des Praktischen Jahres in der <i>Bären-Apotheke</i> Mainz
Mai. 1999 – Okt. 1999	2. Hälfte des Praktischen Jahres in der Qualitätskontrolle von <i>Boehringer Ingelheim</i> Ingelheim
Nov. 1999	3. Staatsexamen
Dez. 1999	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. G. Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie der <i>Philipps-Universität</i> Marburg
Jan. 2000 – Dez. 2002	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg; Betreuung des Praktikums „Arzneimittelanalytik“ (5. Semester Pharmazie)